

**UNIVERSITÉ BLIDA 1****Faculté des Sciences de la nature et la vie**

Département de Biotechnologie

**MÉMOIRE DE MAGISTER**

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Nutrition et Transformation des Aliments

RECHERCHE DE L'EFFET DE LA SPIRULINE SUR LA TOXICITÉ  
ORALE DES MÉTAUX LOURDS (Hg, Cd ET Pb) CHEZ LES RATS  
FEMELLES DE SOUCHE WISTAR.

Par

**Hicham BELLALA**

Devant le jury composé de :

A. BOUTEKRABT	Professeur	Université Blida 1	Président
L. BEN HADJA	Professeur	Université Blida 1	Promotrice
A. DOUMANDJI	Maitre de conférences (A)	Université Blida 1	Co-promotrice
A. HADJ ZIANE	Professeur	Université Blida 1	Examineur
A. BITAM	Maitre de conférences (A)	E. N. S .A	Examineur

Blida, Juin 2014

## RÉSUMÉ

La spiruline est une cyanobactérie de grand intérêt nutritionnel. Elle est consommée comme complément alimentaire, du fait de sa richesse en plusieurs nutriments essentiels et substances bioactives pouvant préserver et améliorer la santé humaine.

Ce travail, a pour objectif d'évaluer l'effet de la spiruline (*Spirulina platensis*) sur les effets toxiques des métaux lourds (Hg, Cd et Pb) par voie orale chez les rats femelles de la souche Wistar.

Au bout de dix semaines d'expérimentation, les rats du lot traité par les trois métaux lourds présentent des signes de toxicité subaiguë qui se manifestent par :

- Des troubles de comportement, perte d'appétit et de poids corporel (31,15 %).
- Diminution de la fertilité avec une foetotoxicité.
- Atteinte hépatique, rénale et pulmonaire, avec une diminution dans le poids absolu et relatif du foie (29,31 %), des reins (17,43 %) et des poumons (30,76 %).
- Anémie et augmentation du nombre des leucocytes (7,47 %) et des plaquettes sanguines (18,33 %).

Chez les rats femelles du lot traité par les trois métaux lourds associés à la spiruline nous avons constaté d'une façon globale une régression de la majorité des effets toxiques observés chez le précédent lot de rats. La spiruline semble avoir sur les rats :

- Un effet calmant très apparent.
- Un effet Stimulant de l'appétit avec augmentation du poids corporel (10,81 %).
- Un effet Stimulant de la fertilité avec une protection des fœtus.
- Effet protecteur sur les reins et l'activité rénale avec une protection des glomérules rénaux.
- Effet protecteur sur le foie et l'activité hépatique rénaux.
- Une Diminution de l'anémie érythrocytaire (28,16 %), stimulation du système immunitaire avec une augmentation du nombre des leucocytes (12,05 %) est également observée.

**Mots clés** : Spiruline, métaux lourds, toxicité, rat Wistar, effet protecteur.

## ABSTRACT

Spirulina is a cyanobacteria which has a great nutritional interest. It is consumed as food complement, because of its richness in several essential nutrients and bioactive substances that can preserve and improve human and health.

The aim of this study is to observe the effect of Spirulina (*Spirulina platensis*) on the toxic effects of heavy metals (Hg, Cd and Pb) in female Wistar rats.

After ten weeks of experimentation, the rats treated with the three heavy metals showed a subacute toxicity manifested by :

- Behavioral disorders, loss of appetite and body weight (31,15 %).
- Decreased fertility with fetotoxicity.
- Liver, renal and lung impairment with a decrease in the absolute and relative weights of liver (29,31 %), kidneys (17,43 %) and lungs (30,76 %).
- Anemia, increased of leukocytes number (7,47 %) and platelets (18,33 %).

Female rats treated with the three heavy metals enriched by spirulina have been found in general regression in the majority of the toxic effects observed in rats without Spirulina. Spirulina appears have on rats :

- A very noticeable calming effect.
- Stimulation of appetite with increased body weight (10,81 %).
- Increase fertility with protection of fetuses.
- Protective effect of Spirulina on the kidneys and renal activity with protection glomeruli renal.
- Protective effect on liver and liver activity,
- Decreased red cell aplasia (28,16 %), stimulation of the immune system with an increase in the number of leukocytes (12,05 %) is observed then.

**Key words:** Spirulina, heavy metal, toxicity, Wistar rat, protective effect.

## ملخص

السيبرولينا من البكتريا الزرقاء ذات فائدة غذائية كبرى. هي مستهلكة كمكاملة غذائية بسبب غناها بالعديد من المواد الغذائية الأساسية والمواد الحيوية النشطة التي يمكن أن تحسن و تحافظ على صحة الإنسان.

هذه الدراسة ، استهدفت تأثير السيبرولينا (*Spirulina platensis*) على الآثار السمية للمعادن الثقيلة (الزئبق ,الكادميوم والرصاص) عند إناث الجرذان ويستار.

بعد عشرة أسابيع من التجارب على الحيوانات، الجرذان المعالجة فقط بالمعادن الثقيلة الثلاثة بينت آثار سمية تحت الحادة و التي تجلت في :

- اضطرابات سلوكية، فقدان الشهية والوزن(31,15%)
- انخفاض الخصوبة مع السمية الجنينية.
- اصابة كبدية، كلوية ورتوية مع انخفاض في الوزن المطلق والنسبي للكبد (29,31 %)
- والكلى (17,43 %) والرئتين (30,76 %)
- فقر الدم، زيادة عدد الكريات البيضاء (7,47 %) والصفائح الدموية (18,33 %)

عند إناث الجرذان المعالجة بالمعادن الثقيلة الثلاثة و السيبرولينا تبين تراجع عام في معظم الآثار السمية الملاحظة عند الجرذان المعالجة بالمعادن الثقيلة. إذ يظهر أن للسيبرولينا على الجرذان:

- تأثير مهدئ ملحوظ جدا
- تأثير محفز للشهية مع زيادة وزن الجسم (10,81%)
- زيادة الخصوبة مع حماية الأجنة.
- تأثير وقائي للسيبرولينا على الكلى والنشاط الكلوي و حماية الكبيبات الكلوية.
- تأثير وقائي على الكبد و النشاط الكبدي.
- انخفاض فقر الدم (28,16%) ، تحفيز الجهاز المناعي مع زيادة في عدد الكريات البيضاء.

**الكلمات المفتاحية :** السيبرولينا ، السمية ، المعادن الثقيلة ، الجرذ ويستار ، التأثير الوقائي.

## REMERCIEMENTS

**D'**abord, je remercie le bon DIEU qui m'a accordé le courage, la patience et la volonté de pouvoir verser cette goutte dans l'océan de la science.

**U**n grand merci à ma promotrice Mme. BOUTEKRABT L. Professeur à Université Blida 1 et ma co-promotrice Mme DOUMANDJI A., MCA à l'université Blida 1, pour m'avoir encadré et pour avoir dirigé ce travail. Je les remercie pour leurs conseils et orientations, qu'elles trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

**M**es sincères remerciements à tous les membres du comité du jury, Mr. BOUTEKRABT A. Professeur à l'université Blida 1, Mme HADJ ZIANE A. Professeur à l'université Blida 1, et Mr BITAM A. MCA à l'Ecole National Supérieure d'Agronomie-Alger, pour leurs efforts. «Je les remercie pour m'avoir honoré de leurs présence et d'avoir accepté de juger mon travail».

**U**n merci spécial pour deux personnes très exceptionnelles, à mon ami et collègue BOUZAR Chihab et Mr ALLEL Dahmen pour leurs présence, affection et générosité inestimables. Ils m'ont aidé et poussé vers l'avant par leurs conseils, leur précieux soutien moral pendant les périodes difficiles.

**M**es vifs remerciements à tous mes amis et collègues au travail à la direction du commerce et toute la promotion de Mars 2011 : Kahina, Kawtar, Naziha, Amina, Fati, Naima, Belkacem, El-hadj et Nourre dine.

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail sans oublier :

**Mr Saïd** responsable du laboratoire de pédologie et tout le personnel du département d'Agronomie, Biologie et chimie industrielle de l'université Blida 1.

**Mr TABAT** responsable du laboratoire de l'ANRH, ainsi que toute son équipe pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Toute l'équipe du laboratoire de physicochimie à l'ITELV –Baba Ali Alger.

**Mr Adel** le responsable de la station d'expérimentation animale de la faculté des Sciences de la nature et la vie de l'université Blida 1 et tous les travailleurs de la station.

**Dr AZINE** le chef service de pharmacologie et toxicologie à CRD SAIDAL d'El Harrach et **Mr Mohamed** le responsable de l'animalerie pour leurs conseils et orientations.

**Mr KABAD** le chef service de laboratoire d'analyse médical de l'hôpital civil de Hadjout et toute l'équipe du laboratoire.

**Mr Cherif** le chef service de laboratoire d'analyse médical du centre d'hémodialyse de Hadjout et tout le personnel du laboratoire.

**Dr BEN HALLAL** et son équipe du laboratoire d'analyse médicale à Blida.

**Mr KHADOUR** le technicien de laboratoire d'anatomie pathologique de l'ENV d'El Harrach Alger pour sa générosité et orientation.

**Dr BOUZIDI**, Docteur spécialiste en d'anatomie pathologique à la polyclinique de Sidi Rachad à Tipaza.

Et à tous ceux que j'aurais oubliés bien involontairement, merci !

## DEDICACES

*Je dédie cet humble travail à ma plus belle source d'inspiration,  
Le plus beau cadeau que le bon dieu m'a offert  
Et à qui je dois tant, Mes parents,*

*A mes sœurs Naima, Amina, Asma, Houda, et mes beaux frères,  
A mes frères Mourad, Brahim, et Halim et mes belles sœurs,  
Ma grand-mère, mes tantes et mes oncles,*

*A Toute ma famille*

*A ce qui m'a partagé les pénibles moments d'achèvement de ce travail, le  
meilleur amis au monde DAHMEN,*

*A tous mes ami(e)s les proches ainsi que les loins...*

*Hichem*

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	1
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIÈRES	7
LISTES DES ILLUSTRATIONS, GRAPHYQUES ET TABLEAUX	12
INTRODUCTION	17

## SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>CHAPITRE 1 : LA SPIRULINE</b>	<b>20</b>
1.1. Historique	20
1.2. Répartition géographique de la spiruline	20
1.3. Biologie de la spiruline	21
1.3.1. Taxonomie	21
1.3.2. Morphologie et caractères généraux	22
1.3.3. Cycle biologique	23
1.3.4. Conditions physiques et chimiques de croissance de la spiruline	23
1.4. Composition de la spiruline	24
1.4.1. Glucides	24
1.4.2. Protéines et acides aminés	24
1.4.2.1. Protéines	24
1.4.2.2. Acides aminés	26
1.4.3. Lipides et acides gras	25
1.4.3.1. Lipides	25
1.4.3.2. Acides gras	26
1.4.4. Vitamines	26
1.4.5. Minéraux	27
1.4.6. Pigments	28
1.5. Valeur nutritionnelle de la spiruline	28
1.6. Effets bénéfiques de la spiruline sur la santé humaine	29
1.6.1. Lutte contre la malnutrition	29
1.6.2. Effet inhibant les effets toxiques de mercure	29

1.6.3. Effet stimulant du système immunitaire	30
1.6.4. Effet hypocholestérolémiant	30
1.6.5. Effet cosmétique	30
1.6.6. Autres effets bénéfiques de la spiruline sur la santé humaine	30
1.7. Phycocyanine et santé	30
1.7.1. Définition	30
1.7.2. Structure chimique de la phycocyanine	31
1.7.3. Propriétés de la de la phycocyanine	31
1.7.4. Effets bénéfiques de la phycocyanine sur la santé	32
<b>CHAPITRE 2 : LES MÉTAUX LOURDS</b>	<b>33</b>
2.1. Définition	33
2.2. Classification	34
2.2.1. Selon la nature chimique	34
2.2.2. Selon l'importance pour l'organisme	35
2.3. Origine des éléments de traces métalliques dans l'environnement	36
2.3.1. Sources naturelles	36
2.3.2. Activités anthropogéniques	36
2.3.3. Agriculture	37
2.3.4. Exploitations minières	37
2.4. Contamination des aliments par les métaux lourds	37
2.5. Toxicité des métaux lourds (Hg, Cd et Pb)	38
2.5.1. Mercure (Hg)	39
2.5.1.1. Métabolisme du mercure	39
2.5.1.2. Mode d'action	40
2.5.1.3. Toxicité	40
2.5.1.3.1. Toxicité aiguë	40
2.5.1.3.2. Toxicité chronique	40
2.5.2. Le Cadmium (Cd)	41
2.5.2.1. Métabolisme du cadmium	41
2.5.2.2. Mode d'action	42
2.5.2.3. Toxicité	42
2.5.2.3.1. Toxicité aiguë	43
2.5.2.3.2. Toxicité chronique	43

2.5.3. Plomb (Pb)	44
2.5.3.1. Métabolisme du plomb	44
2.5.3.2. Mode d'action	45
2.5.3.3. Toxicité	45
2.5.3.3.1. Toxicité aiguë	45
2.5.3.3.2. Toxicité chronique	46
<b>CHAPITRE 3 : NOTIONS DE TOXICOLOGIE ET TOXICOLOGIE ALIMENTAIRE</b>	
3.1. Définitions	47
3.1.1. Toxicologie	47
3.1.2. Toxicocinétique	47
3.1.3. Toxicodynamique	47
3.1.4. Toxicologie alimentaire	48
3.1.5. Risque alimentaire	48
3.1.6. Toxiques	49
3.1.7. Intoxication	49
3.2. Principales formes de toxicité	49
3.2.1. Toxicité aiguë	49
3.2.2. Toxicité sub-aiguë	50
3.2.3. Toxicité chronique	50
3.2.4. Accoutumance	50
3.3. Manifestation de la toxicité	50
3.4. Action des toxiques sur les organismes vivants	51
3.5. Méthodes <i>in vivo</i> : études de toxicologie réalisées en expérimentation	51
3.5.1. Description des essais toxicologiques	52
3.5.2. Etude de la toxicocinétique et du métabolisme	53
3.5.3. Evaluation de la toxicité	54
3.5.2. Détermination de la dose létale 50 (DL <sub>50</sub> )	54
3.5.3. Détermination de la dose sans effet observable (DSEO)	55
3.5.4. Etablissement de la dose journalière admissible (DJA)	55
3.5.4. Sélection de l'espèce animale à tester	55

## MATÉRIEL ET METHODES

1. Matériel	57
1.1. Matériel biologique	57
1.1.1. L'eau	57
1.1.2. Aliment destiné aux rats	58
1.1.3. Spiruline	59
1.1.4. Les animaux de l'expérimentation	59
1.2. Métaux lourds	60
2.2.1. Chlorure de mercure(II) $\text{HgCl}_2$	60
2.2.2. Chlorure de cadmium $\text{CdCl}_2$	61
2.2.3. Acétate de plomb(II) $\text{PbC}_4\text{H}_6\text{O}_4$	61
2. Méthodes analytiques	62
2.1. Analyses physicochimiques de l'eau	63
2.1.1. Détermination de la conductivité électrique	63
2.1.2. Détermination du pH	63
2.1.3. Dosage des Bicarbonates $\text{HCO}_3^-$	64
2.1.4. Dosage du Calcium $\text{Ca}^{2+}$ et Magnésium $\text{Mg}^{2+}$	64
2.1.5. Dosage des chlorures	66
2.1.6. Dosage du sodium $\text{Na}^+$ et potassium	66
2.1.7. Détermination de résidu sec	67
2.2. Analyses physicochimiques de l'aliment des rats	68
2.2.1. Détermination du taux de protéines	68
2.2.2. Dosage de la matière grasse	70
2.2.3. Dosage du calcium	71
2.2.4. Dosage du phosphore	72
2.3. Expérimentation animale	74
2.3.1. Période d'acclimatation et administration des métaux lourds	74
2.3.2. L'accouplement, gestation et mise bas	78
2.3.3. Sacrifice des rats et prélèvement du sang et des organes	79
2.4. Analyses biochimiques du sang	81
2.4.1. Dosage de l'urée	81
2.4.2. Dosage de la créatinine	82
2.4.3. Dosage de l'acide urique	82

2.4.4. Dosage du cholestérol total	83
2.4.5. Dosage des triglycérides	84
2.5. Analyses hématologiques du sang (FNS)	85
2.6. Etude histopathologique	86
2.6.1. Examen macroscopique des organes de rats	86
2.6.2. Examen microscopique des organes de rats	86
2.7. Etude statistique	90

## **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

1. Résultats des analyses physicochimiques	91
1.1. Résultats des analyses physicochimiques de l'eau	91
1.2. Résultats des analyses physicochimiques de l'aliment des rats	93
2. Résultats de l'expérimentation animale	96
2.1. Résultats du suivi du poids, quantité d'aliment ingérée et comportement	96
2.1.1. Résultats de la période d'acclimatation	99
2.1.2. Résultats de la période d'administration des métaux lourds	104
2.1.3. Résultats des dix jours d'accouplement sans métaux lourds	113
2.1.4. Résultats de période de gestation et administration de métaux	115
2.2. Résultats de la reproduction des rats	122
2.3. Résultats des analyses biochimiques du sang des rats	125
2.3.1. Résultats de l'étude statistique des résultats d'activité rénale	125
2.3.2. Résultats de l'étude statistique des résultats d'activité hépatique	128
2.4. Résultats des analyses Hématologiques du sang des rats (FNS)	130
2.4.1. Résultats des analyses de l'FNS des paramètres érythrocytaires	130
2.4.2. Résultats des analyses de l'FNS des paramètres leucocytaires et les plaquettes sanguines	132
2.5. Résultats de l'étude histopathologiques des organes de rats	135
2.5.1. Résultats de l'examen macroscopique des organes de rats	135
2.5.2. Résultats de l'examen microscopique des organes de rats	147
CONCLUSION	150
APPENDICES	154
LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATION	169
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	171

## LISTES DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Observation microscopique de <i>Spirulina platensis</i> .	22
Figure 1.2	Différentes formes prises par la spiruline.	22
Figure 1.3	Cycle biologique de la spiruline.	23
Figure 1.4	Composition nutritionnelle de la spiruline.	28
Figure 1.5	L'extrait naturel de la phycocyanine.	31
Figure 1.6	Structure de la phycocyanine.	31
Figure 2.1	Métabolisation du mercure dans l'organisme humain.	39
Figure 2.2	Métabolisme et toxicité du Mercure dans l'organisme.	41
Figure 2.3	Métabolisme du cadmium dans le corps humain.	42
Figure 2.4	Toxicité aiguë et chronique de cadmium.	44
Figure 2.5	Métabolisme du plomb dans le corps humain.	44
Figure 2.6	Toxicité aiguë et chronique de plomb.	46
Figure 3.1	Variation de facteur de sécurité entre les espèces et les individus.	55
Figure 4.1	Aliment de rats sans spiruline.	58
Figure 4.2	Aliment de rats avec spiruline.	58
Figure 4.3	Spiruline sèche.	59
Figure 4.4	Rats femelles <i>Rattus norvegicus</i> de la souche «Wistar».	60
Figure 4.5	Schéma général de l'étude expérimentale.	67
Figure 4.6	Les différents états des femelles au cours de l'expérimentation.	79
Figure 4.7	Dissection de rat après décapitation.	80
Figure 4.8	Prélèvement des organes (foie, poumons et reins).	80
Figure 4.9	Inclusion et mise en bloc des organes dans la paraffine.	88
Figure 4.10	Coupes histologiques colorées et fixées sur des lames.	90
Figure 5.1	Composition nutritionnelle de l'aliment (sans et enrichi en spiruline) destiné aux rats.	93
Figure 5.2	Evaluation pondérale des 3 lots pendant la durée de l'expérimentation.	96

Figure 5.3	Evaluation de la quantité d'aliment ingérée par les 3 lots pendant la durée de l'expérimentation.	97
Figure 5.4	La courbe d'évaluation pondérale du rat Wistar male et femelle.	101
Figure 5.5	Comparaison entre les organes d'un rat du lot A et un témoin.	136
Figure 5.6	Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle témoin. Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	141
Figure 5.7	Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot A. Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	141
Figure 5.8	Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot B. Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	142
Figure 5.9	Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle témoin. Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	144
Figure 5.10	Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot A. Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	144
Figure 5.11	Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot B. Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	145
Figure 5.12	Histologie du parenchyme pulmonaire d'un rat femelle témoin. Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	147
Figure 5.13	Histologie du parenchyme pulmonaire d'un rat femelle du lot A. Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	147
Figure 5.14	Histologie du parenchyme pulmonaire d'un rat femelle du lot B. Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	148
Tableau 1.1	Répartition géographique de la spiruline dans le monde.	21
Tableau 1.2	Taxonomie de la spiruline.	21
Tableau 1.3	Composition en acides aminés (mg / 100 g de spiruline sèche).	25
Tableau 1.4	Composition en acides gras de 100 g de spiruline sèche.	26
Tableau 1.5	Composition de la spiruline en vitamines (mg / Kg de matière sèche).	26
Tableau 1.6	Composition de la spiruline en minéraux en mg / 10 g de spiruline sèche.	27
Tableau 1.7	Teneur en pigments mg /10 g de matière sèche de spiruline.	28

Tableau 2.1	Les métaux lourds dans le tableau périodique des éléments.	33
Tableau 2.2	Liste des éléments essentiels et non essentiels et exemple de propriétés des éléments connus pour leurs essentialités.	35
Tableau 2.3	Teneur en métaux lourds dans quelques aliments frais.	38
Tableau 3.1	Les principaux tests toxicologiques réalisés en expérimentation animale pour l'identification des dangers.	53
Tableau 4.1	Doses des métaux lourds administrés sur les rats pendant les 7 semaines d'expérimentation.	77
Tableau 4.2	Les valeurs de la DJT et la DL <sub>50</sub> des métaux lourds.	77
Tableau 4.3	Les valeurs de la DJT et la DL <sub>50</sub> selon le poids des rats 225 g.	77
Tableau 4.4	Les valeurs selon la quantité d'eau consommée /rat/Jour 5 ml.	78
Tableau 4.5	Les doses des métaux lourds administrées sur les rats.	78
Tableau 5.1	Résultats des analyses physicochimiques de l'eau de robinet destinée aux rats.	91
Tableau 5.2	Composition en nutriments essentiels de l'aliment destiné aux rats (avec et sans spiruline).	93
Tableau 5.3	Recommandations alimentaires chez le rat aux différents stades physiologiques.	94
Tableau 5.4	Evaluation pondérale des rats pendant la première semaine d'acclimatation.	99
Tableau 5.5	Etude statistique des résultats du poids corporel des rats pendant la première semaine d'acclimatation et leurs significations.	101
Tableau 5.6	Evaluation pondérale des rats pendant la deuxième semaine d'acclimatation.	102
Tableau 5.7	Etude statistique des résultats du poids corporel des rats pendant la deuxième semaine d'acclimatation et leurs significations.	103
Tableau 5.8	Evaluation pondérale et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la première semaine d'administration des métaux lourds.	104
Tableau 5.9	Etude statistique des résultats du poids corporel et quantité d'aliment ingérée par les rats durant la première semaine d'administration des métaux lourds.	105
Tableau 5.10	Evaluation pondérale et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la deuxième semaine d'administration des métaux lourds.	109

Tableau 5.11 Etude statistique des résultats du poids corporel et quantité d'aliment des rats pendant la deuxième semaine d'administration des doses de métaux lourds.	108
Tableau 5.12 Evaluation pondérale et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la troisième semaine d'administration des métaux lourds.	109
Tableau 5.13 Etude statistique des résultats du poids corporel et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la troisième semaine d'administration des métaux lourds et leurs significations.	110
Tableau 5.14 Evaluation pondérale et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la quatrième semaine d'administration des métaux lourds.	111
Tableau 5.15 Etude statistique des résultats du poids corporel et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la quatrième semaine d'administration des métaux lourds et leurs significations.	112
Tableau 5.16 Evaluation pondérale et quantité d'aliment ingérée par les rats des dix jours d'accouplement des rats sans administration des métaux lourds.	113
Tableau 5.17 Etude statistique du poids corporel et la quantité d'aliment ingérée par les rats pendant les 10 jours d'accouplement et leurs significations.	114
Tableau 5.18 Evaluation pondérale et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la cinquième semaine d'administration des métaux lourds.	115
Tableau 5.19 Etude statistique des résultats du poids corporel et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la cinquième semaine d'administration des métaux lourds et leurs significations.	116
Tableau 5.20 Evaluation pondérale et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la sixième semaine d'administration des métaux lourds.	117
Tableau 5.21 Etude statistique des résultats du poids corporel et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la sixième semaine d'administration des doses de métaux lourds et leurs significations.	118

Tableau 5.22	Evaluation pondérale et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la septième semaine d'administration des métaux lourds.	119
Tableau 5.23	Etude statistique des résultats du poids corporel et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la septième semaine d'administration des métaux lourds et leurs significations.	120
Tableau 5.24	Résultats de l'effet des métaux lourds et la spiruline sur la reproduction des rats.	122
Tableau 5.25	Etude statistique des résultats d'analyses biochimiques de l'évaluation d'activité rénale et leurs significations.	125
Tableau 5.26	Etude statistique des résultats d'analyses biochimiques de l'évaluation d'activité hépatique et leurs significations.	128
Tableau 5.27	Etude statistique de la formule numération sanguine (paramètres érythrocytaires) et leurs significations.	130
Tableau 5.28	Etude statistique des résultats de la formule de numération sanguine (paramètres leucocytaires et les plaquettes) et leurs significations.	132
Tableau 5.29	Résultats de l'examen macroscopique des organes de rats.	134
Tableau 5.30	Etude statistique des résultats du poids absolu et relatif du foie des 3 lots et leurs significations.	137
Tableau 5.31	Etude statistique des résultats du poids absolu et relatif des reins des 3 lots et leurs significations.	138
Tableau 5.32	Etude statistique des résultats du poids absolu et relatif des poumons des 3 lots et leurs significations.	139

## INTRODUCTION

Depuis toujours l'alimentation joue un rôle très important dans le maintien et l'amélioration de la santé. La présence de certaines substances toxiques d'origine chimique ou biologique dans l'alimentation peut causer des perturbations des fonctions physiologiques et engendrer des problèmes graves sur la santé humaine [1].

Parmi les substances chimiques hautement toxiques pour l'homme, il y a les métaux lourds. La consommation d'aliments contaminés par ces derniers est nocive et plusieurs pays ont imposé des normes pour limiter leur présence dans les aliments.

La toxicité des métaux lourds peut entraîner des dommages sur le système nerveux central et des dommages à la composition du sang, les poumons, les reins, le foie et d'autres organes vitaux [2].

La spiruline est une cyanobactérie apparue sur la Terre il y a plus de 3,5 milliards d'années. Elle n'a pas évolué. C'est l'ancêtre de tous les organismes vivants, de la lignée animale comme de la lignée végétale. Il existe près de 2000 espèces de Cyanobactéries et seulement 36 espèces d'*Arthrospira* sont comestibles. La principale espèce actuellement présente sur le marché est *Arthrospira platensis*. Elle est cultivée principalement dans les régions tropicales et semi-tropicales de la terre [3].

Quelques études cliniques ont montré les effets thérapeutiques de la spiruline telle que la réduction du cholestérol et de certains cancers par la stimulation du système immunitaire. L'augmentation des Lactobacilles de la flore intestinale, la réduction de la toxicité des reins provoqués par les métaux lourds, les pesticides et les drogues [4].

La phycocyanine, principale pigment de la Spiruline, sa structure est voisine de celle des pigments biliaires. Une trentaine de publications internationales attestent des nombreuses et diverses activités biologiques qu'offre la phycocyanine: antioxydant et antiradicalaire, antiinflammatoire, antitumorale [5].

Sur ce dernier aspect, il est intéressant de constater la puissante capacité de la spiruline et la phycocyanine à protéger les organes vitaux vis à vis des molécules chimiques et autres métaux lourds [5].

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes intéressés à inscrire notre expérimentation dans un contexte visant à mieux connaître l'effet de la spiruline (*Spirulina platensis*) sur les différentes formes de la toxicité orale des métaux lourds toxiques à savoir le mercure (Hg), le cadmium (Cd) et le plomb (Pb) par une expérimentation animale. Nous avons administré par voie orale des doses d'un mélange des métaux lourds (Hg, Cd et Pb) pendant dix semaines (toxicité subaigüe) à un groupe de rats femelles de la souche Wistar, afin d'observer les effets due à la toxicité.

Par la suite, nous nous sommes attelés à :

- ❖ Prouver que la spiruline est dotée d'un pouvoir antitoxique et d'un effet protecteur envers la toxicité des métaux lourds notamment le Hg, Cd, Pb.
- ❖ Evaluer et observer l'effet positif de la spiruline à l'égard de la toxicité des trois métaux lourds et son impact sur :
  - Le comportement, le développement du poids corporel des rats, et la quantité d'aliment ingérée par les rats.
  - La reproduction (fertilité, pré-natalité, mortalité).
  - Les paramètres biochimiques du sang des rats et les fonctions physiologiques des organes vitaux (foie et reins).
  - Les paramètres hématologiques et les éléments figurés du sang.
  - La structure histologique des organes vitaux des rats (foie, reins, poumons).

Ainsi notre démarche expérimentale à été comme suit:

Après une synthèse bibliographique permettant de placer les connaissances de base et le contexte de ce présent travail.

Nous avons dans un deuxième temps présenté le matériel utilisé ainsi que les méthodes d'analyses adoptées.

Enfin, la partie résultats et discussion renferme les principaux renseignements tirais de notre expérimentation.

# CHAPITRE 1

## LA SPIRULINE

### 1.1. Historique

La spiruline est un des plus primitifs organismes apparus sur la Terre il y a plus de 3,5 milliards d'années. Elle n'a pas évolué. C'est l'ancêtre de tous les organismes vivants, de la lignée animale comme de la lignée végétale. Cette algue croît à l'état naturel dans des lacs saumâtres, saturés de soude, dans des régions chaudes de la terre.

Elle est découverte par les européens lors de la conquête de l'Amérique. Dans ses mémoires, le conquistador Cortès rapportait que les Aztèques promenaient à la surface du Lac Texcoco des filets à mailles très serrées pour récolter une sorte de boue colorée qu'ils faisaient sécher au soleil pour former ensuite des galettes appelées "Tecuitlatl" et qu'ils consommaient pour améliorer leurs performances lors d'activités physiques intenses.

En Afrique, certaines tribus du Sahara, consomment depuis bien longtemps la spiruline, puisée dans des lacs et mares où elle croît à l'état naturel, sous forme de galettes nommées "Dihé" [3].

Une mission scientifique redécouvre la spiruline dans les années 40 au Tchad. Les études sur cette algue ne démarrent véritablement que dans les années 60. Dans les années 70, la spiruline devient appréciée dans les pays industrialisés du fait de ses excellentes propriétés nutritionnelles [6].

### 1.2. Répartition géographique de la spiruline

La spiruline se développe préférentiellement dans des eaux chaudes, alcalines et riches en nutriments azotés et phosphorés, mais elle peut aussi se développer dans les eaux saumâtres ainsi que dans les lacs salins des régions tropicales et semi-tropicales [7].

Son caractère thermophile et ses besoins importants en lumière limitent son aire de répartition à une bande intertropicale située environ entre 35° de latitude nord et 35° de latitude sud [8]. (Tableau 1.1).

Tableau 1.1: Répartition géographique de la spiruline dans le monde [8].

Cantinent	Pays
Afrique	Algérie, Tanzanie, Soudan, Tchad, Djibouti, Zambie, Ethiopie, Madagascar, Congo, Kenya.
Asie	Inde, Pakistan, Myanmar, Thaïlande, Sri Lanka.
Amérique du sud	Pérou, Uruguay, Mexique, Equateur.
Amérique du nord	Californie (USA), République Dominicaine.
Europe	Hongrie, France (Camargue).

### 1.3. Biologie de la spiruline

#### 1.3.1. Taxonomie

La spiruline est une cyanobactérie; elle appartient donc au domaine des bactéries et se classe parmi les bactéries Gram négatives. Les cyanobactéries forment l'essentiel des bactéries capables de photosynthèse avec production d'oxygène et peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires [9]. Le tableau 1.2 présente la taxonomie de la spiruline.

Tableau 1.2: Taxonomie de la spiruline [3].

<b>Règne</b>	Monera
<b>Sous règne</b>	Procaryota
<b>Phylum</b>	Cyanophyta
<b>Classe</b>	Cyanophyceae
<b>Ordre</b>	Nostocales
<b>Famille</b>	Oscillatoriaceae
<b>Genre</b>	<i>Arthrospira</i>
<b>Espèce</b>	<i>Arthrospira platensis</i> , <i>A. Maxima</i> , <i>A. Lonar</i>

### 1.3.2. Morphologie et caractères généraux

La spiruline est une cyanophycée microscopique d'une longueur moyenne d'environ 250  $\mu\text{m}$ . Elle est composée de filaments mobiles de 10 à 12  $\mu\text{m}$  de diamètre non ramifiés et enroulés en spirale, généralement en 6 ou 7 spires (Figure 1.1). Cette forme hélicoïdale lui donne l'allure d'un minuscule ressort ce qui lui a valu son appellation de «**Spiruline**» [10].

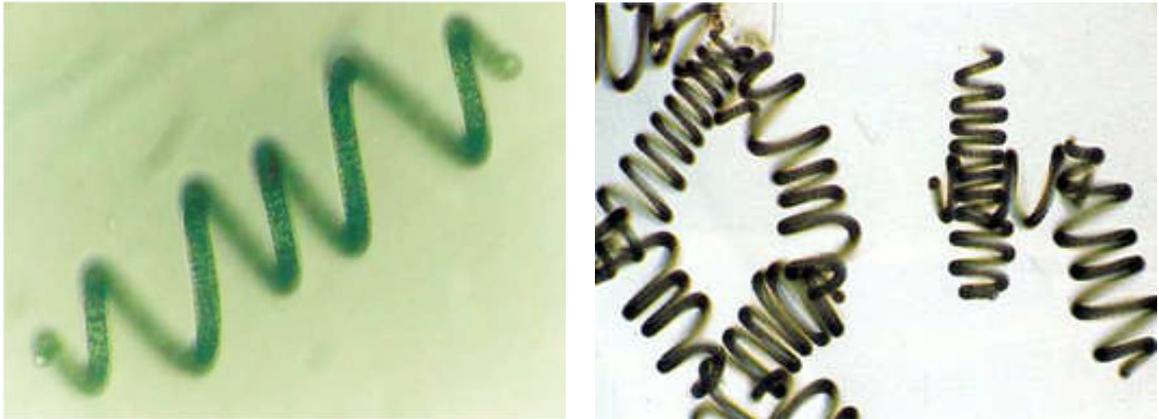


Figure 1.1 : Observation microscopique de *Spirulina platensis* [11].

Cependant les spirulines se présentent sous différentes formes (Figure 1.2). On trouve des formes spiralées classiques, ondulées et parfois droites. La spiruline est constituée de cellules transparentes empilées bout à bout formant ainsi un filament appelé trichome.

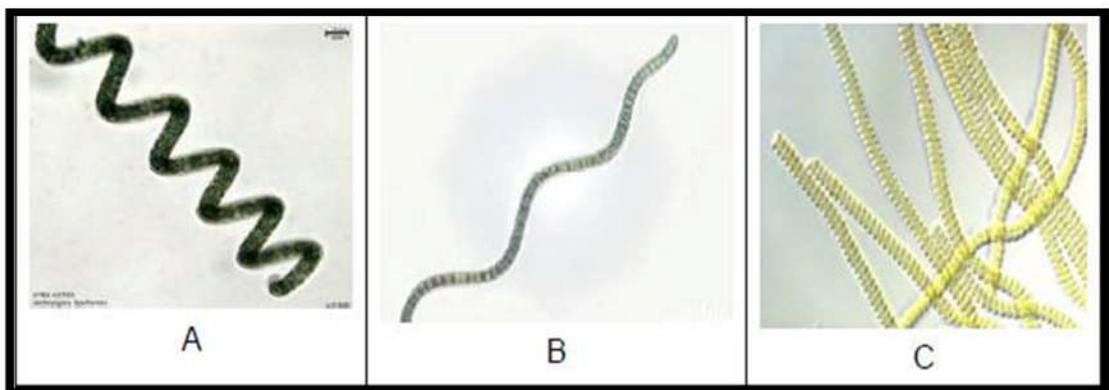


Figure 1.2 : Différentes formes prises par la spiruline [9].

L'enroulement du trichome sur lui-même s'effectue suivant le sens des aiguilles d'une montre lorsqu'on regarde au dessus de la spirale. Les facteurs environnementaux tels que la température auraient cependant une influence sur l'orientation de l'hélice. Cette morphologie typique lui permet de se déplacer dans l'eau en adoptant le mouvement d'une vis [11].

### 1.3.3. Cycle biologique

Le cycle biologique est schématisé dans la Figure 1.3 ci-dessous. A maturité, le filament de spiruline forme des cellules spéciales appelées nécriidies. Elles se différencient des autres cellules par leur aspect biconcave et sont assimilées à des disques de séparation. A partir de ces derniers, le trichome se fragmente pour donner de nouveaux filaments de 2 à 4 cellules appelés hormogonies. Ces dernières vont croître en longueur par division binaire et prendre la forme typique hélicoïdale [12].

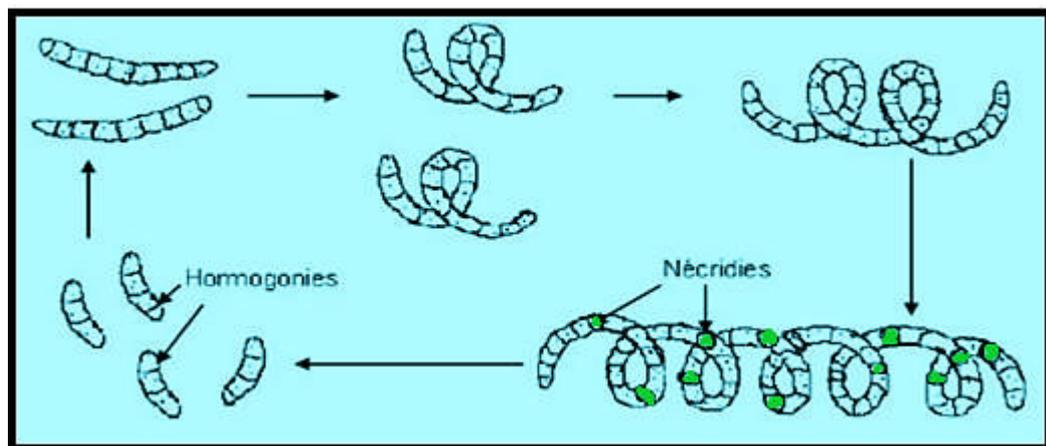


Figure 1.3: Cycle biologique de la spiruline [13].

### 1.3.4. Conditions physiques et chimiques de croissance de la spiruline

Pour se développer, la spiruline a besoin d'éléments minéraux simples tels que l'eau, les sels minéraux, le  $\text{CO}_2$  et l' $\text{O}_2$  qu'elle puise directement dans son milieu tout en utilisant la lumière solaire comme source d'énergie grâce à son système pigmentaire. La spiruline croît dans des milieux naturels caractérisés par des eaux saumâtres, chaudes, alcalines ( $8 < \text{pH} < 11,5$ ) et natronées (fortement concentrées en bicarbonates).

En règle générale les phosphates, les carbonates, les nitrates et le fer, sont les éléments limitant de la production de la spiruline dans les milieux aquatiques.

La spiruline se développe dans des eaux chaudes (28 à 40 °C) et bénéficiant d'une intensité lumineuse élevée [14].

#### 1.4. Composition de la spiruline

La composition de la spiruline dépend des éléments chimiques dont elle dispose dans le milieu. En milieu cultivé, il est possible de jouer sur les intrants et d'influer sur sa composition. La culture en bassin permet en tous les cas de maîtriser la qualité [9].

##### 1.4.1. Glucides

Les glucides constituent globalement 15 à 20 % de la matière sèche de la spiruline avec très peu de glucides simples 7-8 % ; ce sont le glucose, le fructose et le saccharose. On trouve aussi des polyols comme le glycérol, le mannitol et le sorbitol, mais surtout des glucides complexes (polymères) tels que des glucosanes aminés (1,9 %) et des rhamnosanes aminés (9,7 %) et du glycogène (0.5 %) [6].

Notons que les polysaccharides de la spiruline auraient des effets de stimulation des mécanismes de réparation de l'ADN [14].

Un nouveau polysaccharide très soluble dans l'eau, d'une structure complexe et d'un poids moléculaire élevé (10 million Daltons) a été isolé chez *Spirulina platensis*, il a été dénommé «Immulina» pour son effet activateur des monocytes et des macrophages humains. La spiruline contient entre 0,5 % et 2,0 % (de son poids sec) de ce polysaccharide [11].

Ce micro-organisme ne possède pas de paroi cellulosique mais une enveloppe relativement fragile, constituée essentiellement de polysaccharides. Cette faible teneur en cellulose explique son importante digestibilité qui varie de l'ordre de 75 à 83 % [15].

##### 1.4.2. Protéines et acides aminés

###### 1.4.2.1. Protéines

La teneur en protéines de la spiruline est élevée. Elle représente 10 à 11 % de sa masse humide, soit 60 à 70 % de sa matière sèche [16] ; [17]. Ce

pourcentage est bien plus élevé que celui du poisson (25%), du soja (35%), de la poudre de lait (35%) ou des céréales (14%) [18].

#### 1.4.2.2. Acides aminés

La spiruline contient tous les acides aminés essentiels qui représentent 47 % du poids total des protéines, et elle contient également tous les acides aminés non essentiels [19] (Tableau 1.3).

Tableau 1.3 : Composition en acides aminés (mg / 100 g de spiruline sèche) [11].

<b>Acides aminés essentiels</b>	<b>Teneur</b>	<b>Acides aminés non essentiels</b>	<b>Teneur</b>
Isoleucine	3500	Alanine	4590
Leucine	5380	Arginine	4310
Lysine	2960	Acide aspartique	5990
Méthionine	1170	Cystine	590
Phénylalanine	2750	Acide glutamique	9130
Thréonine	2860	Glycine	3130
Tryptophane	1090	Tyrosine	2500
Valine	3940	Proline	2380
Histidine*	1000	Sérine	2760

\* Essentiel pour l'enfant.

#### 1.4.3. Lipides et acides gras

##### 1.4.3.1. Lipides totaux

La teneur en lipides totaux de la spiruline varie de 6 à 13 % [20]. De ces lipides totaux nous distinguons les lipides saponifiables (83 %) et insaponifiables (17 %) contenant essentiellement des paraffines, des pigments et des stérols [16]. Les triglycérides sont rares, 0,3 %, et on détecte en outre 4,6 % de phospholipides indéfinis [11].

### 1.4.3.2. Acides gras

La spiruline présente un rapport Oméga 6 / Oméga 3 très pertinent pour la physiologie humaine [3]. Les acides gras essentiels de la spiruline préviendraient notamment l'accumulation du cholestérol dans les artères et, par conséquent, diminuent les risques de maladies cardiovasculaires [21] (Tableau 1.4).

Tableau 1.4 : Composition en acides gras de 100 g de spiruline sèche [22]

Acide gras	Taux (%)
Acide myristique (C14)	0,23
Acide palmitique (C16)	25,8
Acide palmitoléique (C16:1)	1,26
Acide Palmitique (C16:0)	46,07
Acide oléique (C18:1)	5,26
Acide Linoléique (C18:2)	17,43
Autres acides	20,88

### 1.4.4. Vitamines

La spiruline a également une teneur extrêmement élevée en vitamine A [23] et elle est la deuxième source de vitamines du groupe B après la levure de bière [24].

La spiruline est riche en vitamine B12 qui est la vitamine la plus difficile à obtenir dans un régime sans viande (végétarien), et aucun végétal courant n'en contient (la spiruline étant plus riche en vitamine B12 que le foie du bœuf [25] (Tableau 1.5).

Tableau 1.5 : Composition de la spiruline en vitamines (mg / Kg de matière sèche) [26].

Vitamines	Teneur	ANC *
β Carotène (pro-A)	1 700	1,8
Thiamine (B1)	55	1,3
Riboflavine (B2)	40	1,6

Pyridoxine (B6)	3	1,8
Cyanocobalamine (B12)	0,4	0,0024
Acide ascorbique (C)	traces	110
Tocophérol (E)	190	12
Acide nicotinique (PP) ou B3	118	14
Acide folique (B9)	0,5	0,33
Biotine (H) (B8)	0,4	0.05

\* Apports nutritionnels conseillés (mg/jour pour un adulte) par l'AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire et alimentaire).

#### 1.4.5. Minéraux

La spiruline contient tous les minéraux essentiels [27], comparée au riz, au blé, au maïs ou encore au soja. La spiruline contient 4 à 10 fois plus de potassium, 10 à 80 fois plus de sodium, et 70 fois plus de calcium que le lait [3] (Tableau 1.6).

Tableau 1.6 : Composition de la spiruline en minéraux en mg / 10 g de spiruline sèche [6].

<b>Minéraux</b>	<b>Teneur de spiruline</b>	<b>ANC (mg/jour)*</b>
Calcium	13 – 140	900
Phosphore	67 – 90	750
Magnésium	20 – 29	360-420
Fer	5,80 -18	9 – 16
Zinc	0,21 - 0,40	10 – 12
Cuivre	0,08 - 0,10	1,5 – 2
Sodium	45	500
Potassium	64 – 154	3500

\* Les apports nutritionnels conseillés par l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire et Alimentaire).

### 1.4.6. Pigments

La spiruline contient des chlorophylles, dont la chlorophylle A (typique des végétaux), des caroténoïdes dont le principal est le  $\beta$ -carotène, la phycocyanine et la phycoérythrine [28] (Tableau 1.7).

Tableau 1.7 : Teneur en pigments en mg /10 g de matière sèche de spiruline [28].

Pigments	Teneur en mg / 10g
Chlorophylles totales	115
Chlorophylle A	61-75
Caroténoïdes (orange)	37
Phycocyanine (bleu)	1500-2000
Phycoérythrine (rouge)	2900-10000

### 1.5. Valeur nutritionnelle de la spiruline

Quand on examine la composition de la spiruline, on déduit rapidement sa valeur nutritionnelle importante (figure 1.4).

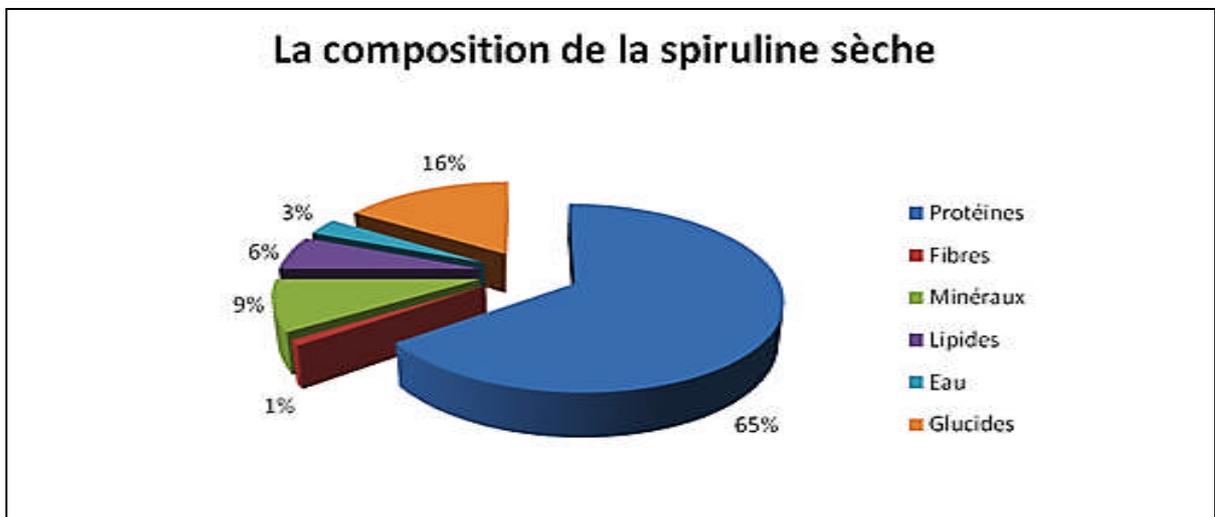


Figure 1.4: Composition nutritionnelle de la spiruline [29].

#### ✓ Sa teneur très élevée en protéines

Du point de vue qualitatif, les protéines de la spiruline sont complètes, car tous les acides aminés essentiels y figurent. De plus, tous ces acides aminés essentiels se retrouvent en quantité équilibrée [27].

✓ Sa composition en minéraux essentiels et oligoéléments

La spiruline contient tous les oligoéléments et les minéraux essentiels nécessaires à la vie de l'organisme [27].

✓ Sa composition en vitamine

La Vitamine A (sous forme de précurseur: le  $\beta$ -carotène) est présente dans la spiruline en quantité particulièrement élevée. On y retrouve également la vitamine E ainsi que toutes les vitamines du groupe B, particulièrement la rare vitamine B12. Une dose de 4 g/jour de spiruline séchée suffit amplement à couvrir la totalité des besoins en vitamine B12 [30].

✓ Son apport en acides gras essentiels

La spiruline renferme les acides gras essentiels oméga 3 et oméga 6 en très bon équilibre. Les acides gras essentiels de la spiruline sont plus facilement assimilables que ceux de l'huile de soja et offriraient de meilleurs bénéfices cardiovasculaires [31].

## 1.6. Effets bénéfiques de la spiruline sur la santé humaine

Quelques études cliniques montrent les effets thérapeutiques de la spiruline telle que la réduction du cholestérol et des cancers par la stimulation du système immunitaire, l'augmentation des Lactobacilles de la flore intestinale, la réduction de la toxicité des reins due aux métaux lourds et les drogues ainsi que la protection contre les radiations [4].

### 1.6.1. Lutte contre la malnutrition

Selon le rapport de FAO (30/10/2006), la malnutrition touche plus de 30 % de la population mondiale, et selon l'OMS et l'UNICEF, un (01) enfant sur trois (03) en Afrique et un (01) enfant sur cinq (05) en Asie souffrent de malnutrition. Par sa facilité de culture, sa simplicité de récolte, son équilibre nutritionnel, la spiruline pourrait constituer une solution efficace aux problèmes de la malnutrition. [32].

### 1.6.2. Effet inhibant les effets toxiques de mercure

Une étude expérimentale a été réalisée sur des rats en Japon, elle montre qu'il est possible d'inhiber les effets toxiques du chlorure mercurique chez les rats en les soumettant à un régime contenant 30% de *Spirulina platensis*. La Spiruline et la phycocyanine jouent un rôle majeur dans les effets protecteurs contre le

dysfonctionnement rénal causé par le chlorure mercurique et l'application de la spiruline permet de diminuer le dysfonctionnement général des reins. [33].

#### 1.6.3. Effet stimulant du système immunitaire

Plusieurs expériences positives ont été réalisées sur les animaux montrant que la spiruline régulerait favorablement le système immunitaire en augmentant l'activation des macrophages et les cellules naturellement destructrices (NK) [34].

#### 1.6.4. Effet hypocholestérolémiant

Les acides gras polyinsaturés (AGPI), oméga 3 et oméga 6, de la spiruline préviendraient l'accumulation du cholestérol dans l'organisme [35].

#### 1.6.5. Effet cosmétique

La spiruline est utilisée dans les masques cryogéniques et crèmes anti-âge pour son action sur le renouvellement cellulaire, et elle est aussi utilisée en synergie avec d'autres algues comme agent cicatrisant et antiseptique [36].

#### 1.6.6. Autres effets bénéfiques de la spiruline sur la santé humaine

Une diminution du diabète [37]; une activité anti-inflammatoire sur les articulations [38]; une hépatoprotection [33].

### 1.7. Phycocyanine et la santé

#### 1.7.1. Définition

La phycocyanine est le principal pigment présent dans la micro-algue *Spirulina platensis*. C'est le seul colorant bleu alimentaire naturel (figure 1.5 ) autorisé en Europe et il est également utilisé dans quelques produits cosmétiques. Ce phytopigment protéique fluorescent absorbe et capture les photons puis transforme cette énergie lumineuse en énergie électrochimique. Le groupe bilin qui la constitue est très proche des pigments biliaires de l'homme. Ce qui pourrait expliquer son activité détoxifiante et hépatoprotectrice. [5].



Figure 1.5 : L'extrait naturel de la phycocyanine. [5].

### 1.7.2. Structure chimique de la phycocyanine

Habituellement composée de 2 sous-unités protéiques :

- sous-unité  $\alpha$  : 20,5 KDa
  - sous-unité  $\beta$  : 23,5 KDa
- } Apoprotéine

Et d'un chromophore : molécules de phycocyanobiline constituées du groupe bilin commun aux 3 phycobiliprotéines = groupe prosthétique.

Groupe bilin : constitué du noyau tétrapyrrolique de la chlorophylle ouvert et sans magnésium [5].

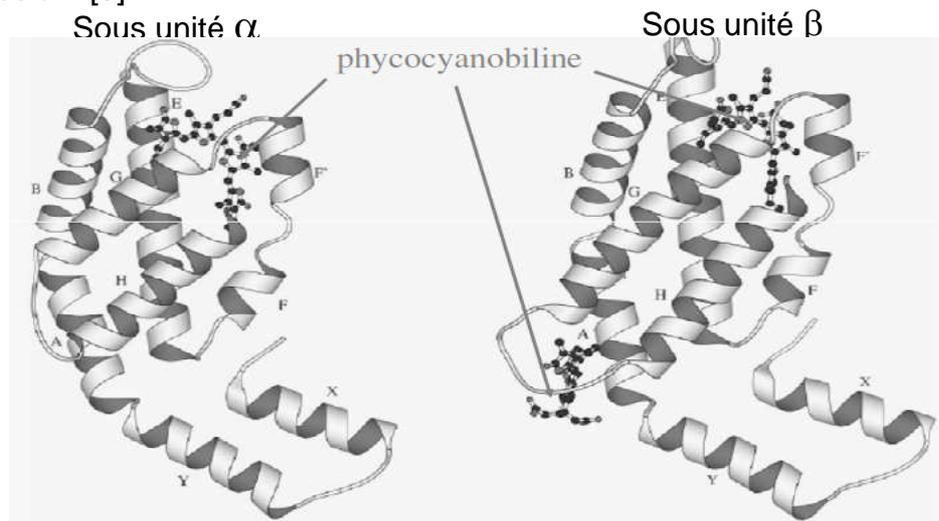


Figure 1.6 : Structure de la phycocyanine. [5]

### 1.7.3. Propriétés de la Phycocyanine

- Vitalisante.
- Stimulante de la production de cellules souches.
- Régénérante sanguine.
- Immunomodulante et immunostimulante.
- Protectrice cérébrale, hépatique et cardio-vasculaire.
- Régulatrice du cholestérol et de l'agrégation plaquettaire.

- Anti-oxydante, Antiallergique, Anti-cancérigène, Anti-leucémique et Anti-inflammatoire. [5].

#### 1.7.4. Effets bénéfiques de la phycocyanine sur la santé

La phycocyanine a la capacité de développer des propriétés bénéfiques pour la santé des consommateurs, démontrées au cours de nombreuses expériences réalisées in vitro et in vivo chez différents modèles animaux. L'extrait liquide de la spiruline fraîche permet d'avoir une bio-disponibilité total des molécules sous leurs formes natives.

Pour l'effet anti-tumoral : Plusieurs études montrent que la spiruline ou ses extraits permettent d'empêcher ou d'inhiber des cancers chez l'humain ou l'animal. [5].

On croit que certaines formes communes du cancer sont le résultat de l'ADN cellulaire endommagé, provoquant ainsi une croissance cellulaire déchaînée. Des biologistes spécialisés en cytologie ont défini un système d'enzymes spéciales dites endonucléase qui répare l'ADN endommagé permettant de garder les cellules vivantes et saines. Lorsque ces enzymes sont désactivées sous l'effet de la radiation ou des toxines, les erreurs de codage de l'ADN ne sont pas réparées et le cancer peut se déclarer. Selon des études in vitro, les polysaccharides spécifiques de la spiruline permettent d'améliorer l'activité enzymatique du noyau cellulaire et la synthèse réparatrice de l'ADN [4].

La phycocyanine de la spiruline stimule aussi la production du sang [4]. Des études ont montré que la phycocyanine influait sur les cellules souches situées dans la moelle osseuse. Celles-ci servent de cellules souches à la fois aux globules blancs qui constituent le système immunitaire cellulaire et aux globules rouges qui assurent l'oxygénation de l'organisme. Des scientifiques chinois ont prouvé que la phycocyanine stimulait l'hématopoïèse, reproduisant l'effet de l'hormone érythropoïétine. Celle-ci, produite par des reins sains, règle la production par les cellules souches des globules rouges dans la moelle osseuse.

Les scientifiques affirment également que la phycocyanine règle la production de cellules blanches, même quand les cellules souches dans la moelle osseuses trouvent endommagées sous effet de produits chimiques toxiques ou des radiations [4].

## CHAPITRE 2

### LES MÉTAUX LOURDS

#### 2.1. Définition

Les éléments de traces métalliques (ETM) sont les éléments dont la concentration dans la croûte terrestre est inférieure à 1 g/Kg. Cette définition est aujourd'hui utilisée à la place du terme "métaux lourds", métaux qui possèdent des masses volumiques supérieures ou égales à 4.5 g.cm<sup>3</sup> et sont associés souvent aux métalloïdes comme l'arsenic ou le sélénium [39].

Tous les éléments (tableau 2.1), qui ont de l'affinité avec le soufre, sont bio-accumulables et toxiques, pourraient tout aussi bien être classés dans la famille des métaux lourds. Néanmoins, si on se limite à la définition historique, on ne doit retenir, comme métaux lourds, que le mercure, le plomb et le cadmium.

Les métaux existent dans la nature sous différentes formes: ions, complexes inorganique et organique, en solution ou adsorbés sur des colloïdes. Dans l'organisme les métaux lourds se trouvent normalement dans les protéines, dont certaines servent comme enzymes, qui sont des biocatalyseurs du métabolisme [40].

Tableau 2.1 : Les métaux lourds dans le tableau périodique des éléments [41].

Elément																			
1																	2		
H																	He		
3	4													5	6	7	8	9	10
Li	Be													B	C	N	O	F	Ne
11	12													13	14	15	16	17	18
Na	Mg													Al	Si	P	S	Cl	Ar
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr		
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54		
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe		
55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71			
Cs	Ba	La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu			
			72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86		
			Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn		
87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103			
Fr	Ra	Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr			

Métaux lourds
Non-métaux et métalloïdes associés

## 2.2. Classification

### 2.2.1. Selon la nature chimique

En 1980, NIEBOER et RICHARDSON ont envisagé une classification chimique de l'ensemble des métaux. Cette classification repose sur les propriétés des ions métalliques par rapport à la définition des acides selon LEWIS, afin de séparer les ions en trois classes [42].

#### 2.2.1.1. Ions métalliques de classe A

Les ions métalliques de la classe A sont des acides forts. Ils ont une préférence pour les liaisons avec les ligands dont l'oxygène est pris comme atome donneur d' $e^-$ . On peut citer à ce titre, les phosphates, les groupes fonctionnels carbonyles et carboxyliques. Cette classe comprend également les ions qui sont considérés comme d'importants éléments nutritifs (ions majeurs), tels que  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$  [42].

#### 2.2.1.2. Ions métalliques de la classe B

Ces métaux s'imbriquent facilement avec les groupes fonctionnels suivant: Sulphydyle (- SH) ; Disulphide (-S-S) ;Thioether (- SR) et Amine (-  $NH_2$ ) parmi eux (les ions métalliques) on peut citer:  $Cu^{2+}$ ,  $Ag^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  et  $Pb^{2+}$  (IV) [42].

#### 2.2.1.3. Ions métalliques de classe intermédiaire

Les ions métalliques relevant de cette classe présentent un comportement intermédiaire. A titre d'exemple, les ions de zinc se lient au sulfure dans la métallothionéine. Il s'agit des ions qui sont incorporés dans les dépôts granulaires de phosphate de calcium.

Ils existent aussi dans les tissus des invertébrés et jouent un rôle dans le processus de détoxification. La liaison des métaux se présente de telle sorte qu'ils ne lient pas vraiment ou qu'ils ne sont pas désirés. Les cations métalliques suivants appartiennent à cette classe sont :  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  [42].

### 2.2.2. Selon l'importance pour l'organisme

Les organismes sont capables, dans une certaine mesure, d'utiliser et de réguler les concentrations en métaux qui sont essentiels. Des effets toxiques apparaissent lorsque cette régulation ne peut plus avoir lieu. En effet, le caractère essentiel d'un métal dépend aussi des organismes : vu un métal donné pouvant être essentiel à un organisme tout en ne l'étant pour d'autres. Dans le tableau 2.2, on propose une liste des métaux présentant un intérêt pour les organismes vivants. Comme tout composé chimique, l'effet de l'apport d'un métal dépend de la dose. Mais lorsque le métal est essentiel, aussi bien sa carence que son excès sont dommageables [43].

Tableau 2.2 : Liste des éléments essentiels et non essentiels et exemple de propriétés des éléments connu pour leurs essentialités [43].

	<b>Métal</b>	<b>Propriétés connues</b>
<b>Métaux essentiels</b>	Chrome (Cr)	Impliqué dans le métabolisme du glucose (insuline)
	Cobalt (Co)	Présent dans la vitamine B12 intervenant dans la formation de l'hémoglobine.
	Cuivre (Cu)	Présent dans les cytochromes et l'hémocyanine, des molécules impliquées dans la respiration cellulaire.
	Fer (Fe)	Présent dans l'hémoglobine pour le transport de l'oxygène.
	Iode (I)	Présent dans la thyroxine et lié aux composants assurant le bon fonctionnement du système thyroïdien.
	Manganèse (Mn)	Rôle dans le métabolisme des sucres (pyruvate carboxylase) impliqué dans la synthèse des acides gras et des glycoprotéines.
	Molybdène (Mo)	Impliqué dans les transferts d'électrons, la fixation de l'azote est aussi couplée à une réaction au molybdène.
	Nickel (Ni)	Composant de l'uréase et fait donc partie du cycle du CO <sub>2</sub> .
	Sélénium (Se)	Active la glutathion peroxydase pour l'élimination des radicaux libres.

		Régulation des messages intracellulaires.
	Vanadium (V)	Cofacteur d'enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique.
		Agent thérapeutique possible pour les diabètes
		Nécessaire au fonctionnement des déshydrogénases, aldol ases, isomérases.
Zinc (Zn)	ransphosphorylases, ARN et ADN polymérase, anhydrase carbonique, Cu-Zn super oxyde dismutase (et autres).	
<b>Métaux non essentiels</b>	Antimoine (Sb) ; Plomb (Pb) ; Thallium (Tl) ; Argent (Ag) ; Arsenic (As) ; Cadmium (Cd) ; Etain (Sn) ; Mercure (Hg).	

### 2.3. Origine des éléments de traces métalliques dans l'environnement

#### 2.3.1. Sources naturelles

Parmi les importantes sources naturelles, l'activité volcanique, l'altération des continents et les incendies de forêts sont cités. La contribution des volcans peut se présenter sous forme d'émissions volumineuses mais sporadiques dues à une activité explosive, ou d'émissions continues de faible volume, résultant notamment de l'activité géothermique et du dégazage du magma. Les principales sources de mercure atmosphérique, par exemple, proviennent du dégazage des terres et des océans [44].

#### 2.3.2. Activités anthropogéniques

Un grand nombre de pollutions ont pour origine, la source anthropique. Ils peuvent résulter des industries, les transports, l'agriculture, les décharges de déchets ménagers, Les exploitations minières, corrosion de canalisations etc... [44].

L'entrée de ces éléments dans le milieu aquatique peut résulter des déversements directs ou indirects des polluants des industries telles que des fonderies par exemple qui dégagent des émissions gazeuses (As, Hg, Mo, Se Pb, Cu, Ni, Zn, Cd, non ferreux) et (Cr, Ni, Mn ferreux) qui contaminent le milieu aquatique, par les eaux de pluie (forme indirecte). La contamination directe passe par le biais des déversements dans le milieu aquatique des effluents des usines

telles les cimenteries qui émettent des Ta, Cr, Pb. Il en résulte de même pour les industries de traitement de surface (cadmiage, zingage, galvanisation, chromage, étamage, nickelage, anodisation de l'aluminium) qui peuvent rejeter des effluents liquides contenant du Cr, Zn, Cd. Les transports sont également à l'origine de la pollution anthropique. Car on peut observer une contamination en Pb et Cd sur une bande de 10 à 20 m le long de l'axe routier. Dans les décharges de déchets ménagers, les métaux lourds sont régulièrement présents [45].

### 2.3.3. Agriculture

L'épandage d'engrais peut amener des métaux tels que Sr, Ba, Mn, F, Zn, Cd provenant des craies phosphatées et des phospho-gypses. L'origine des minerais phosphatés jouent un rôle prépondérant : 200 mg.L<sup>-1</sup> de cadmium dans les gisements d'Idaho (aux Etats Unis), 100 ppm dans certains gisements d'Afrique de l'ouest mais 1 ppm seulement en provenance de Kola (Russie) [45].

Les effluents d'élevage peuvent également apporter du Cu, Zn et Mn. En effet, les rations alimentaires des porcs, volailles et des bovins sont enrichies en Cu (35 à 175 mg.L<sup>-1</sup>) et en Zn (150 à 250 mg.L<sup>-1</sup>) et se retrouvent intégralement dans les lisiers et fumiers [45].

Les produits phytosanitaires sont aussi un vecteur des éléments de traces métalliques tel le cuivre (c'est le cas de la bouillie Bordelaise : sulfate de cuivre additionné de chaux) qui est utilisé comme fongicide. L'étain et l'arsenic peuvent également entrer dans la formulation de certains pesticides [45].

### 2.3.4. Exploitations minières

Les éléments métalliques sont en concentration très importante sur les sites miniers. Lorsque les métaux sont inclus dans les minerais, ils sont peu altérables donc peu mobiles. Les risques résultent de l'érosion des sulfures, par oxydation à l'air, forment de l'acide sulfurique et se solubilise ainsi en métal [45];[46].

## 2.4. Contamination des aliments par les métaux lourds

L'étude des différents facteurs d'exposition montre que l'apport d'origine alimentaire représente plus de 90 % de l'apport total en métaux lourds pour la population générale [47]. L'homme est menacé en tant que consommateur de denrées alimentaires d'origine animale : essentiellement abats (foie et rein, sites principaux de concentration) mais aussi les poissons, les mollusques, les crustacés. Les denrées alimentaires d'origine végétale présentent généralement

des teneurs faibles que celles des aliments cités précédemment. Cependant, dans une démarche d'évaluation du risque, l'apport dû aux céréales, légumes et fruits ne peut être négligé en raison de la part d'importance de ces aliments dans la consommation alimentaire totale [48] (Tableau 2.3).

Tableau 2.3: Teneur en métaux lourds dans quelques aliments frais [49].

Les métaux	Céréales	Viandes	Poisons et Crustacés	Produits laitiers	Légumes
Aluminium (mg/kg)	0,5 - 3,6	0,01-1,46	0,01-36,36	0,01-61,7	0,2-39,3
Cadmium (µg)	<1,7	<0,17-267	<1,7-614	<1,7-271	<1,7-257
Cuivre (mg/kg)	0,06-3,6	0,3-6,3	0,9-5,8	0,05-0,5	0,2-9,5
Zinc (mg/kg)	9,6-21,4	12,6-87,5	13,9-27,1	2,7-8,6	1,4-39,8
Mercure (µg)	1,7 - 17	3-25	2 -330	0-9	0,9-10
Plomb (µg)	<2,5 -23,5	<2,5-179	12-1023	<2,5-95	4,2-197

La concentration des polluants dans l'ensemble de ces aliments s'appuie sur les phénomènes de transfert du sol vers la plante, du sol à l'animal, de plante vers l'animal lorsque celui-ci l'ingère et enfin de l'animal ou de la plante vers l'homme [47].

### 2.5. Toxicité des métaux lourds (Hg, Cd, Pb)

On peut classer les métaux lourds par leur degré de toxicité en :

- 1-Les éléments relativement peu toxiques ou rarement toxiques quelque soit leurs mobilités et leur solubilités sont l'aluminium, le calcium, magnésium etc. ....
- 2-Les éléments toxiques mais relativement mobiles sont le cadmium, mercure, cuivre, nickel, zinc, chrome, etc....
- 3-Les éléments toxiques mais souvent peu solubles sont le titane, baryum, tungstène...

Cette mobilité et solubilité peuvent être différentes selon le milieu considéré. La facilité de transfert dans la phase aqueuse de ces éléments de traces métalliques est déterminée par ordre de leur mobilité. Ainsi, on a : Ni > Zn > Cd > Cr > Pb > Cu [45].

La toxicité aigue d'un métal dépend de plusieurs facteurs :

- De la forme dans laquelle un élément se trouve par exemple le nombre d'oxydation en tant que composé organométallique.
- De la manière dont il est absorbé (par voie orale, par inhalation).



### 2.5.1.2. Mode d'action

L'activité cytotoxique du mercure est liée d'une part à sa grande affinité pour le soufre, entraînant le blocage des fonctions thiol (-S-H) des protéines (modifiant ainsi leur structure tertiaire et quaternaire), des peptides ou des acides aminés soufrés. Les protéines ainsi inactivées peuvent être des enzymes, des protéines des membranes cellulaires, des protéines membranaires impliquées dans les transports ioniques ou encore la tubuline et la myéline, ce qui provoque de graves perturbations dans la conduction de l'influx nerveux [51].

- D'autre part, le mercure inhibe les systèmes de protection cellulaire contre les radicaux libres.

- Le mercure inhibe les enzymes à zinc du fait d'une compétition entre ces deux métaux [52].

- Les effets clastogènes du mercure ont été observés dans des lymphocytes de sujets ayant ingéré des poissons contaminés par du méthylmercure : cassure de chromosomes, présence de fragments ou de chromosomes surnuméraires, absence de centromère [53].

### 2.5.1.3. Toxicité

#### 2.5.1.3.1. Toxicité aiguë

Une action de  $\text{Hg}^0$  à des concentrations élevées (1 à 3  $\text{mg}/\text{m}^3$ ) pendant une courte période (1 à 3 heures) conduit à des manifestations d'intoxication aiguë dont les signes cliniques sont ceux d'une pneumonie [51].

Suite à une absorption par voie orale, les sels de  $\text{Hg}^{2+}$  provoquant des brûlures de la cavité buccale, du pharynx, et de l'œsophage, accompagnés de nausées et de vomissements [51] (Figure 2.2).

#### 2.5.1.3.2. Toxicité chronique

Lors de longues exposition répétées au  $\text{Hg}^0$  (0,1 à 0,2  $\text{mg}/\text{m}^3$ ), on observe des tremblements, de l'érythisme mercuriel, une hypersialorrhée, des stomatites et gingivites, un goût de métal en bouche [52].

Les reins sont les organes cible d'une intoxication par le  $\text{Hg}^{2+}$  (polyurie jusqu'à l'anurie). Suite à une ingestion de  $\text{Hg}^{2+}$  chez le jeune enfant, l'acrodynie (ou pink disease) regroupe un ensemble de symptômes tels que l'irritabilité, l'insomnie, la photosensibilité, et un érythème généralisé [51] (Figure 2.2).

L'organe cible des composés organiques du mercure est le système nerveux central où la réaction avec les groupes sulfhydriles et les acides nucléiques (ADN, ARN) induit une perturbation de la synthèse protéique, de la structure membranaire, de l'utilisation de l'oxygène et la mort des cellules. Le méthylmercure est surtout préjudiciable aux domaines sensoriels. Les premiers symptômes cliniques sont des paresthésies suivies d'ataxie, de déficiences auditives et visuelles [53] (Figure 2.2).

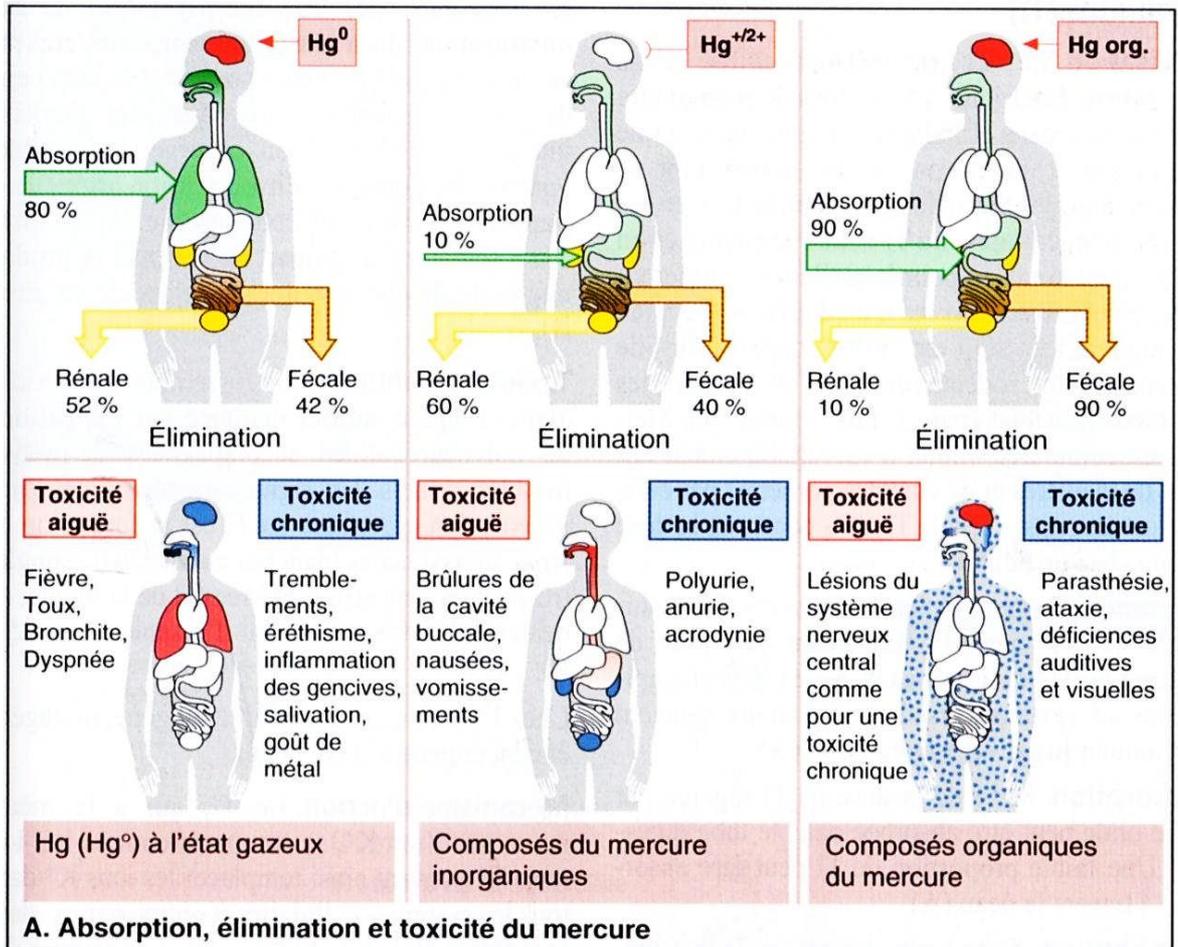


Figure 2.2 : Métabolisme et toxicité du Mercure dans l'organisme [51].

## 2.5.2. Cadmium

### 2.5.2.1. Métabolisme du cadmium

Le cadmium pénètre dans l'organisme principalement par voie respiratoire (jusqu'à 50% sous forme d'aérosols) [53]. L'absorption intestinale du cadmium est faible, diminuée par le calcium et l'acide phytique. Cependant, le cadmium ingéré est probablement la source majeure du cadmium accumulé par l'homme durant sa vie [53].

Après pénétration dans l'organisme, le cadmium circule dans le sang en grande partie lié à l'hémoglobine et se fixe de façon diffusé, mais surtout au niveau du rein et du foie, après liaison aux groupements –SH d'une protéine de transport et de stockage, la métallothionéine, dont il induit d'ailleurs la synthèse intracellulaire. Le cadmium s'élimine très lentement, surtout par voie urinaire et digestive (on retrouve 90% à 95% du cadmium ingéré dans les fèces) (Figure 2.3), accessoirement par la sueur et le salive ; on peut aussi le retrouver dans les phanères [53].

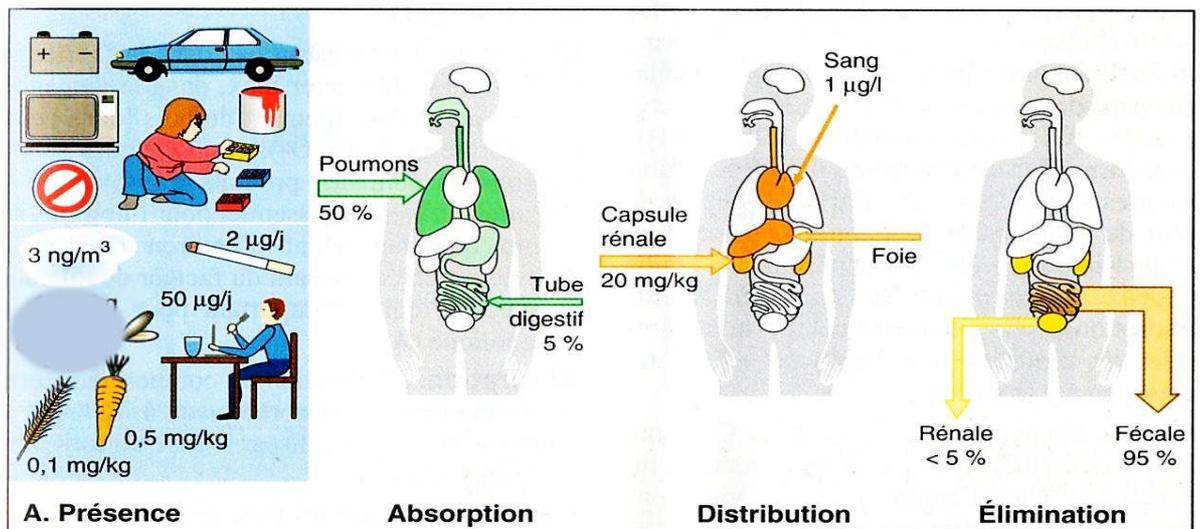


Figure 2.3 : Métabolisme du cadmium dans le corps humain [51].

#### 2.5.2.2. Mode d'action

Le cadmium perturbe l'absorption du fer et du cuivre en entrant en compétition avec leurs transporteurs. Il se substitue au calcium et modifie la perméabilité membranaire, cellulaire et intracellulaire. A l'intérieur de la cellule, du fait de sa forte affinité pour les groupements thiols, il inhibe les enzymes contenant du zinc et perturbe la fonction respiratoire. Le cadmium inhibe l'ARN polymérase et perturbe la synthèse protéique. Enfin, le cadmium se lie à l'ADN du noyau [52].

#### 2.5.2.3. Toxicité

La dose hebdomadaire tolérable pour l'homme est de 7 mg/kg de poids corporel [62]. Le cadmium n'est pas un élément essentiel pour l'homme, le métal lui-même, ainsi que ses composés, sont extrêmement toxiques. Les intoxications par le Cd et ses composés sont le plus souvent dues à l'ingestion d'aliments contaminés [54].

#### 2.5.2.3.1. Toxicité aigue

L'intoxication aigue par voie alimentaire fait observer d'abord des signes digestifs bruyants avec vomissement, douleurs abdominales et diarrhée auxquels succèdent des troubles cardiaques parfois responsables d'un collapsus cardiovasculaire, puis en fin, des troubles rénaux qui restent la signature finale et spécifique de l'intoxication cadmique [54].

L'inhalation des vapeurs et fumées concentrées d'oxyde de cadmium peut être à l'origine d'une pneumopathie pouvant constituer un œdème aigue du poumon et évoluer vers la mort [53]. Chez l'homme la dose létale liée à une inhalation et de  $6 \text{ mg/m}^3/8\text{h}$  (Figure 2.4) [51].

#### 2.5.2.3.2. Toxicité chronique

Sur le plan de chronicité, le cadmium est également nocif. C'est un toxique cumulatif, capable de s'accumuler dans les chaînes alimentaires.

Il perturbe divers métabolismes, peut occasionner :

- Des lésions rénales qui affectent les tubules proximaux et de traduisent notamment par une protéinurie ;
- Des lésions dentaires pouvant se manifester par une coloration jaune au niveau du collet des dents (imputable au sulfure de cadmium formé à partir de l'élimination salivaire) ;
- Des lésions osseuses avec ostéomalacie (déformation) et déminéralisation, caractérisant la maladie « Itai-Itai » des japonais ;
- De l'emphysème, des lésions pulmonaires [52].

Par sa présence dans l'environnement le cadmium pourrait cependant, du fait du processus d'accumulation des doses, participer au risque d'hypertension et à l'augmentation de fréquence des cancers rénaux et prostatiques, voire pulmonaires. Enfin les enfants seraient encore plus sensibles que les adultes à l'action délétère du cadmium (Figure 2.4) [52].

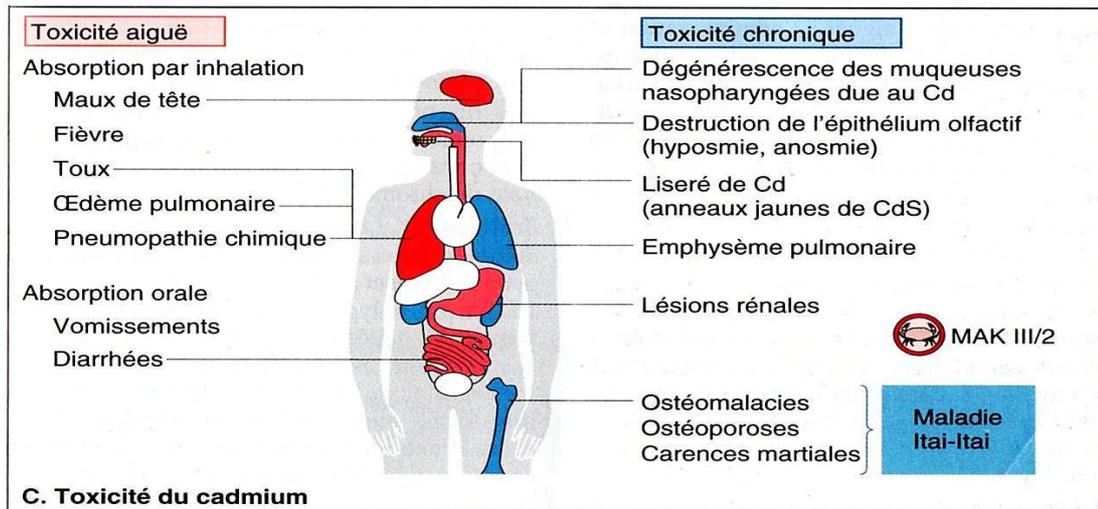


Figure 2.4 : Toxicité aiguë et chronique de cadmium [51].

### 2.5.3. Plomb

#### 2.5.3.1. Métabolisme du plomb

Le plomb absorbé par l'organisme par inhalation ou par ingestion est distribué par le sang à différents organes : le foie, les reins, la rate, la moelle osseuse et surtout les os. Le plomb sanguin ne représente que 1 à 2 % de la quantité totale de plomb présent dans l'organisme ; les tissus mous (reins, foie, rate...) en contiennent 5 à 10 % et plus de 90 % est fixée sur les os [51] (Figure 2.5).

Le plomb est principalement (75 %) éliminé dans les urines. 15 à 20 % du plomb sont éliminés dans les fèces. Le plomb est également excrété dans la salive, la sueur, les ongles, les cheveux [51] (Figure 2.5).

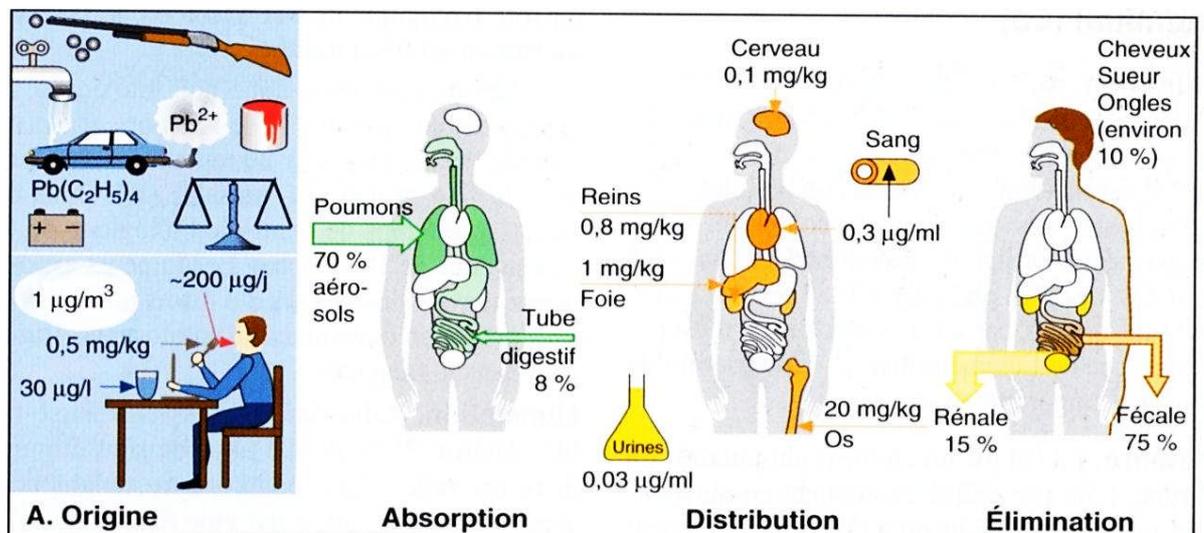


Figure 2.5 : Métabolisme du plomb dans le corps humain [51].

### 2.5.3.2. Mode d'action

La toxicité des composés de plomb est en rapport avec leurs hydrosolubilités, le plomb serait plus toxique lorsqu'il est pris avec l'eau de boisson qu'en mélange avec les aliments. La toxicité du plomb s'exerce au niveau de la biosynthèse de l'hème. Ces perturbations entraînent des concentrations anormales de précurseurs de l'hème dans le sang. Le plomb agit essentiellement en inhibant l'acide delta-aminolévulinique déshydratase (AAL-D), l'èmesynthétase et l'enzyme assurant le passage du coproporphyrine III au coproporphyrinogène IX [53].

La toxicité du plomb au niveau de l'érythrocyte se manifeste par l'inhibition de certaines enzymes qui se traduit par un raccourcissement de la longévité des hématies et la précipitation des hématies de nucléosides pyrimidiques formant des granulations basophiles [53].

En générale le plomb provoque des néphropathies avec comme conséquence l'élévation de l'azotémie, de l'uricémie, la diminution de la clairance de la créatinine et l'apparition d'une protéinurie [53] (Figure 2.6).

### 2.5.3.3. Toxicité

#### 2.5.3.3.1. Toxicité aiguë

L'intoxication aiguë par le plomb est rare. Elle est en effet secondaire à une ingestion massive ou l'administration parentérale d'un dérivé inorganique. Elle ne doit pas être confondue avec les manifestations aiguës de l'intoxication chronique.

L'intoxication aiguë évolue en deux phases. Deux à 48 heures après la prise surviennent des douleurs abdominales, des vomissements et parfois une diarrhée. Ces troubles digestifs sont habituellement modérés et de brève durée. Ils s'accompagnent d'une hémolyse (toujours discrète), d'une hépatite cytolitique (dose-dépendante, elle ne s'observe qu'en cas d'intoxication massive) et d'une atteinte tubulaire rénale. Plus rarement, des arthralgies et/ou des signes d'atteinte neurologique centrale (céphalées, agitation, délire, hallucinations) sont également notés [54].

### 2.5.3.3.2. Toxicité chronique

Le plomb est un toxique cumulatif dont l'intoxication à long terme est le saturnisme.

- Son action neurotoxique se traduit par une encéphalopathie convulsivante (maux de tête violents, hallucinations, crises convulsives...) pouvant aboutir à un coma mortel. En cas d'intoxication sévère, on peut observer des troubles neurocomportementaux et une détérioration intellectuelle. Le système nerveux des enfants est particulièrement exposé à l'action du plomb [55].
- La toxicité rénale, souvent tardive, correspond à une atteinte des tubules et se manifeste par la présence de sang et de protéines dans les urines. On peut donc aussi observer une atteinte vasculaire caractérisée par une hypertension artérielle. Le plomb diminue l'élimination urinaire de l'acide urique. L'uricémie est fréquemment élevée chez les individus intoxiqués par le plomb.
- L'atteinte de la moelle osseuse et du sang entraîne une diminution du nombre de globules rouges, d'où une anémie chez l'homme [54] (Figure 2.2).

Le plomb est toxique pour le testicule, ce qui conduit à une diminution du taux de spermatozoïdes. Chez la femme gestante, le plomb traverse facilement la barrière placentaire et va s'accumuler dans les os du fœtus, mais ne semble pas tératogène. Des études récentes, chez les rats, ont mis en évidence une activité cancérogène du plomb, en particulier au niveau des reins [56].

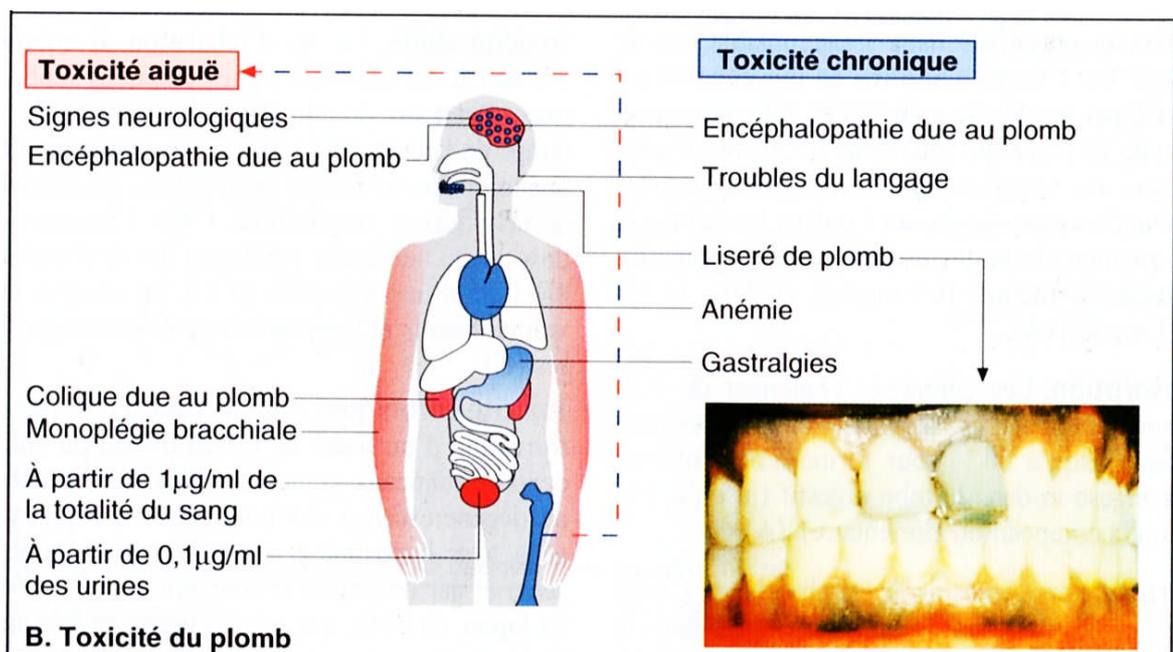


Figure 2.6 : Toxicité aiguë et chronique du plomb [51].

## **CHAPITRE 3**

### **NOTIONS DE TOXICOLOGIE ET TOXICOLOGIE ALIMENTAIRE**

#### 3.1. Définitions

##### 3.1.1. Toxicologie

Le terme toxicologie désigne, *Toxico* : en latin signifie poison et *Logos* : science «la toxicologie comme étant la science qui s'intéresse aux toxiques, à leurs propriétés, à leur devenir dans l'organisme à leur mode d'action, à leur recherche dans différents milieux et aux moyens (préventifs et curatifs) permettant de combattre leur nocivité [57].

La toxicologie est : « la discipline qui étudie les substances toxiques ou poisons c'est-à dire les substances qui provoquent des altérations ou perturbations des fonctions de l'organisme conduisant à des effets nocifs donc le plus grave, de toute évidence, est la mort de l'organisme en question. De ces définitions, il en vient à conclure que la notion de la toxicité est liée à l'ensemble des organismes vivants dans un écosystème. Son objectif étant de définir les doses dangereuses, des seuils admissibles de concentration en produits nocifs [58].

La toxicologie est l'ensemble des investigations destinées à évaluer la toxicité des polluants sur les espèces vivantes » [59].

##### 3.1.2. Toxicocinétique

La toxicocinétique est l'étude du devenir des substances exogènes toxiques, dans les organismes vivants, depuis leurs pénétration jusqu'à leurs élimination, en tenant compte de la vitesse et de la concentration avec laquelle elles apparaissent sous leurs forme de départ ou sous forme métabolisée à l'endroit ou elles vont développer leurs action toxique. Par rapport à la pharmacocinétique qui étudie uniquement les substances à des concentrations thérapeutiques, la toxicocinétique s'attache soit à des xénobiotiques soit à des substances nutritives, thérapeutiques ou endogènes quand des phénomènes toxiques proviennent de la saturation des mécanismes physiologiques de métabolisme ou d'élimination [60].

##### 3.1.3. Toxicodynamique

La toxicodynamique est l'étude qui s'intéresse à l'effet toxique, lorsqu'un organisme absorbe des produits chimiques, divers effets biologique peuvent se

produire et se révéler bénéfiques ou néfastes. La notion d'effet toxique suppose des conséquences nocives pour l'organisme. La toxicité englobe l'ensemble des effets néfastes d'un toxique sur un organisme vivant. L'effet toxique est lié à la dose, voie d'absorption, type et gravité des lésions ainsi qu'au temps nécessaire à l'apparition d'une lésion [60].

#### 3.1.4. Toxicologie Alimentaire

La toxicologie alimentaire est une discipline de la toxicologie, elle porte plus particulièrement son attention sur les molécules se trouvant dans les aliments, qui peuvent être présente naturellement (substance toxiques et antinutritives), ou de contaminations, de traitements des animaux et des végétaux (médicaments, pesticides ...), d'additions (additifs alimentaires) ou formées à l'intérieur au cours des processus technologique ou de la conservation [61].

#### 3.1.5. Risque alimentaire

Le risque alimentaire qui est défini comme étant la probabilité de survenue d'un évènement de santé dans une population sur une période de temps donnée. En fait les aliments, qui sont à la fois source de vie en tant que pourvoyeurs des nutriments indispensables au développement et à la subsistance de l'individu et source de déséquilibres éventuellement graves lorsqu'ils ne sont pas utilisés avec discernement par celui-ci, sont redoutés et stigmatisés en tant que vecteurs de deux types de dangers pouvant compromettre leurs sécurité :

- Les dangers biologiques : incluant les bactéries, champignons, virus, parasites et les agents non conventionnels tels que les prions.
- Les dangers chimiques : incluant les contaminants chimiques de l'environnement et les résidus de substances intentionnellement utilisées en production végétale (pesticides et fongicides, métaux lourds), les résidus de substances intentionnellement utilisées en production animale (résidus d'antibiotiques et des médicaments vétérinaires), les substances utilisées en technologie alimentaire (additifs alimentaires) et des substances naturelles toxiques bio-synthétisées par les plantes (alcaloïde et substances antinutritionnelles) et les moisissures (mycotoxines). La contamination des aliments par ces dangers peut avoir lieu aux différents stades de leur production, transformation et conservation [1].

### 3.1.6. Toxiques

Une substance est dite toxique lorsque sa présence à une concentration donnée dans un milieu considéré ou bien son absorption à une dose donnée, entraîne chez les organismes vivants des perturbations du fonctionnement métabolique ou physiologique susceptible d'aboutir à la mort de l'organisme[62].

Le toxique est une substance qui provoque des altérations des fonctions de l'organisme au niveau moléculaire, cellulaire ou de l'organisme à une certaine dose donnée [62].

### 3.1.7. Intoxication

L'intoxication est la survenue, au cours d'une contamination, de manifestations biologiques ou cliniques pathologiques. En cas de contamination massive, l'intoxication est aiguë. Elle peut aussi être chronique, modérée. Les signes d'intoxication peuvent être dus à une neuro-toxicité, une hémato-toxicité, une hépato-toxicité, ou à une néphro-toxicité [63].

## 3.2. Principales formes de toxicité

L'évaluation de la toxicité conduit à définir trois approches basées sur les facteurs, dose et durée. Pour une même substance toxique, les êtres vivants peuvent présenter des troubles physiologiques variés selon les quantités absorbées et la durée d'exposition. On distingue en général trois formes d'intoxication qui sont mesurées en fonction de leur gravité [57] :

### 3.2.1. Toxicité aiguë

Elle est la manifestation la plus spectaculaire de la nocivité d'un poison. Elle résulte d'une exposition ou d'une absorption de courte durée pouvant entraîner une mort certaine dans l'immédiat. Ces essais sont généralement réalisés sur des organismes jeunes pendant une période de 14 -28 jours, elle est déterminée par la DL<sub>50</sub> [64].

Le test de toxicité aiguë constitue l'essai de référence classiquement mis en œuvre par exemple par les normes ISO et AFNOR. Ce test, qui permet d'une part, une classification du degré de toxicité des substances ou des effluents considérés nocifs, constitue une étape préliminaire précédant le test chronique et d'autre part, de mieux prévoir la gamme des concentrations à considérer lors du test prolongé [57, 65 et 66].

### 3.2.2. Toxicité sub-aiguë

Elle résulte de l'exposition fréquente ou répétée sur une période de plusieurs jours ou semaines. Dans cette forme de toxicité, une proportion significative de population peut survivre à l'intoxication, bien que présentant des signes cliniques liés à l'absorption du toxique [63]. Dans ce contexte, l'admission de doses ou du maintien de l'organisme dans le milieu renfermant une concentration définie en substance à étudier pendant des durées définies atteint moins de 10% de la durée de vie de l'organisme étudié [57 et 64].

### 3.2.3. Toxicité chronique

Elle suppose une exposition continue des très faibles quantités du contaminant sur une espèce à une longue période. Cette exposition peut aller de plusieurs jours à toute une vie, voire davantage selon le cycle reproductif de l'organisme à étudier [67]. Cette forme de toxicité résulte de l'effet cumulatif de certaines substances qui vont être partiellement ou totalement retenu dans un organisme vivant du fait de leurs liposolubilités ou de leurs affinités chimique. Cet effet est capable de provoquer des manifestations toxiques ainsi que des bouleversements physiques, chimiques et physiologiques de l'espèce [68].

Le test de toxicité chronique sur *Daphnia magna* met en évidence, sur une durée de 21 jours, les effets de substances sur la survie ou mortalité, la croissance, la ponte, le physiologie, la cytologie, la production d'oxygène. Tous ces paramètres ont fait l'objet de discussions de différentes organisations internationales [1 et 69].

### 3.2.4. Accoutumance

L'accoutumance est la disparition des modifications induites par des substances toxiques après une certaine période d'exposition ; il faut alors augmenter les doses pour produire les mêmes effets.

On peut considérer l'accoutumance comme un stade dangereux de l'intoxication chronique avec modification morphologique [70].

## 3.3. Manifestation de la toxicité

La toxicité est la manifestation quantitative ou qualitative des concentrations des produits nocifs donnés dans un milieu, ou son absorption se fait à des doses données. Ce qui entraîne des conséquences directes sur les organismes vivants du milieu.

Elle a diverses manifestations auprès de ces organismes vivants. Ces manifestations peuvent être des stressés, des troubles des fonctions physiologiques et métaboliques chez des organismes supérieurs pouvant aboutir à la mort. [57].

En réalité, toute substance est toxique potentiellement mais elle n'acquiert ce rôle, qu'après absorption au delà d'une dose seuil chez les organismes vivants.

En général, les essais de toxicité chronique sont beaucoup plus difficiles à réaliser que ceux de la toxicité aiguë. Selon cette toxicité, l'étude des polluants de type métallique retiendra notre attention. Ainsi, il y a lieu de faire une ébauche de compréhension sur les mécanismes qui accompagne la toxicité des polluants [57].

#### 3.4. Action des toxiques sur les organismes vivants

Le mécanisme d'accumulation et de décontamination des polluants dépend de l'état physiologique de l'organisme. Les variations d'accumulation semblent être liées au phénomène d'absorption supplémentaire sur la paroi cellulaire, dans le cas des eaux fortement oxygénées. Par contre, le phénomène d'accumulation des concentrations des métaux lourds dans l'eau n'est pas seulement lié aux paramètres physico-chimiques du milieu mais aussi au choix de l'espèce utilisée. [70].

L'accumulation des polluants diffère en fonction des espèces. Toute espèce n'est pas bon bioindicateur. C'est pourquoi le principal facteur contrôlant les proportions des éléments de traces métalliques dans les fractions intra et extracellulaire reste l'espèce utilisée [71].

Il est important de remarquer que certains polluants sont souvent acceptés par les éléments d'un écosystème aquatique (cas des algues pour l'autoépuration) qui parfois les utilise sous forme de nutriments [72].

#### 3.5. Méthodes «in vivo»: études de la toxicologie réalisées en expérimentation animale

La plupart des données toxicologiques utilisées pour l'évaluation des risques proviennent d'études menées chez l'animal; ces études étant effectuées selon des protocoles d'essais normalisés et largement acceptés. Il existe de nombreux protocoles à cet effet. Quel que soit le protocole utilise, toutes les études doivent

respecter les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) et les procédures normalisées d'assurance et de contrôle de la qualité [73].

Des spécifications concernant les caractéristiques minimales que doivent présenter les données destinées à l'évaluation des risques présentes par les aliments sont généralement disponibles et utilisées. Il s'agit notamment des spécifications concernant le nombre d'espèces ou de souches, l'utilisation d'animaux des deux sexes, le choix des doses, la voie d'exposition et la taille des échantillons [73].

Généralement les essais réalisés en expérimentation animale pour l'identification de danger comprennent : l'étude de la toxicité orale aiguë, l'étude de la toxicité à court terme, l'étude de la toxicité subchronique, l'étude de la toxicité à long terme ou chronique et de cancérogenèse, l'étude de la toxicité de la reproduction, l'étude de l'immunotoxicité. Ces études permettent de mettre en évidence le potentiel toxique d'une substance chimique qui se traduit par la survenue à court ou à long terme, d'effets adverses soit de nature fonctionnelle (réactions d'intolérance, perte de poids, changement de comportement...), soit de nature morphologique (hypertrophie, atrophie, effets hormonaux, nephrocalcinose....), soit de nature néoplasique (induction et promotion d'une tumeur) ou soit des effets adverses sur la fonction de reproduction et/ou sur le développement (réduction de la fertilité, stérilité, embryotoxicité, tératogénicité... ) [73 et 74].

### 3.5.1. Description des essais toxicologiques

Etudes de la toxicité orale aiguë, à court terme, subchronique et chronique et études de la toxicité sur la fonction de reproduction, le système immunitaire et le système nerveux. La description des essais toxicologiques réalisés en expérimentation animale est présentée dans le tableau 3.1. Ces essais diffèrent essentiellement par leur objectif, la durée de leur exécution, le niveau de dosage qui y est impliqué ainsi que le nombre d'espèces animales utilisées [1].

Tableau 3.1. Les principaux tests toxicologiques réalisés en expérimentation animale pour l'identification des dangers [1].

Tests Description	Tests Description
Toxicité orale aigue	Administration d'une seule dose afin de définir l'étendu de la toxicité de la substance en l'absence d'autres données et de déterminer la dose létale 50.
Toxicité à court terme	Administration de doses journalières réitérées pour une durée de 14 -28 jours afin de fournir des indicateurs utiles sur le potentiel toxique.
Toxicité subchronique	Administration de doses journalières réitérées pour une durée de 90 jours afin de fournir de l'information sur les sites majeurs de toxicité ainsi que sur les effets toxiques. Utilisée surtout pour la conception des études de toxicité chronique.
Toxicité à long terme et cancérogénèse	Administration de doses journalières réitérées pour une durée d'une année (cas des non rongeurs) ou de deux ans (cas des rongeurs). Les données dérivées de ces études sont souvent la base de l'évaluation de risque des produits chimiques.
Toxicité de la reproduction	Administration de doses journalières réitérées avant, pendant et après la gestation afin de déterminer les effets sur la fonction de reproduction, de gestation et sur le développement du fœtus et du nouveau ne et d'éventuels effets héréditaires.
Immunotoxicité	Investigation sur la structure et le fonctionnement des tissus et des cellules responsables de l'activité et de l'intégrité du système immunitaire, intégrée dans les tests de toxicité à court terme et subchronique.
Neurotoxicité	Investigation sur la structure et le fonctionnement du système nerveux, intégrée dans les tests de toxicité à court terme et subchronique.

### 3.5.2. Etude de la toxicocinétique et du métabolisme

Comme la toxicité chimique résulte de l'interaction d'une substance ou l'un de ses métabolites avec les constituants de l'organisme, les études de toxicocinétique ou de métabolismes semblent être indispensables pour compléter l'évaluation de la toxicité des substances chimiques. En fait la toxicocinétique est le terme utilisé pour décrire le mouvement du produit chimique ou l'un de ses métabolites dans l'organisme, son absorption, sa distribution, son métabolisme et son élimination [1].

Le métabolisme constitue une étape majeure de la toxicocinétique. Il s'agit des réactions de biotransformations, catalysées par des enzymes intra ou extra cellulaires ou les enzymes de la microflore intestinale, aboutissant soit :

- A la conversion de la substance en un constituant de l'organisme,
- A la détoxification du produit ingéré par la formation de métabolites inactifs et leur élimination de l'organisme par voie urinaire ou biliaire,
- A l'activation du produit ingéré par la formation de métabolites réactionnels réagissant avec les protéines tissulaires, l'ADN, l'ARN,.....

Les études de toxicocinétique fournissent donc de l'information, chez les différentes espèces animales, sur l'étendu de l'absorption de la substance à partir du tractus digestif (biodisponibilité), l'étendu de la distribution avec un accent particulier sur les organes/ tissus qui montrent une accumulation après administration répétée (identification des organes/tissus cibles de toxicité) et sur les principaux voies d'élimination : métabolisme et/ ou excrétion urinaire ou biliaire dans les conditions déterminant la dose sans effet observable (DSEO). Cette information est utile pour avoir un aperçu du devenir éventuel de la substance chez l'homme [1].

Généralement ces études ont deux rôles bien distincts dans l'évaluation toxicologique des substances chimiques :

- Lors de la conception des études animales, elles permettent d'identifier l'espèce appropriée pour ces études, et le niveau approprié d'essais à exécuter.
- Lors de l'extrapolation des données de la toxicologie expérimentale à l'homme, elles permettent d'élucider le mécanisme de toxicité de la substance, facilitant ainsi l'établissement de la Dose Sans Effet Observable (DSEO); de plus une comparaison des données de toxicocinétique entre l'animal et l'homme aide à fournir de l'information sur la pertinence à l'homme des effets toxiques observés chez l'animal [75 et 76].

### 3.5.3. Evaluation de la toxicité

#### 3.5.3.1. Détermination de la dose létale 50 (DL<sub>50</sub>)

La DL<sub>50</sub> est la dose qui donnée en une seule fois provoque dans un délai de 14 jours la mort de la moitié de la population animale (en mg/Kg de poids corporel) [63].

### 5.3.2. Détermination de la dose sans effet observable (DSEO)

La DSEO est quantité maximale de substance toxique qui peut être ingérée par un animal quotidiennement, pendant toute sa vie, sans provoquer de troubles physiologiques (en mg/Kg de poids corporel) [63].

### 5.3.3. Etablissement de la dose journalière admissible (DJA)

Elle est calculée à partir de la DSEO.

DJA humaine = DSEO / 100 (en mg/Kg de poids corporel)

Un facteur x 10 = facteur spécifique : on suppose que l'espèce humaine est 10 fois plus sensible que l'espèce animale testée la plus sensible.

Un facteur x 10 = facteur de sécurité individuel : dans un groupe humain, tous les individus n'ont pas la même sensibilité; certains peuvent être 10 fois plus sensibles que la moyenne (enfants, femmes enceintes, personnes âgés,...) [1] (Figure 4.1).

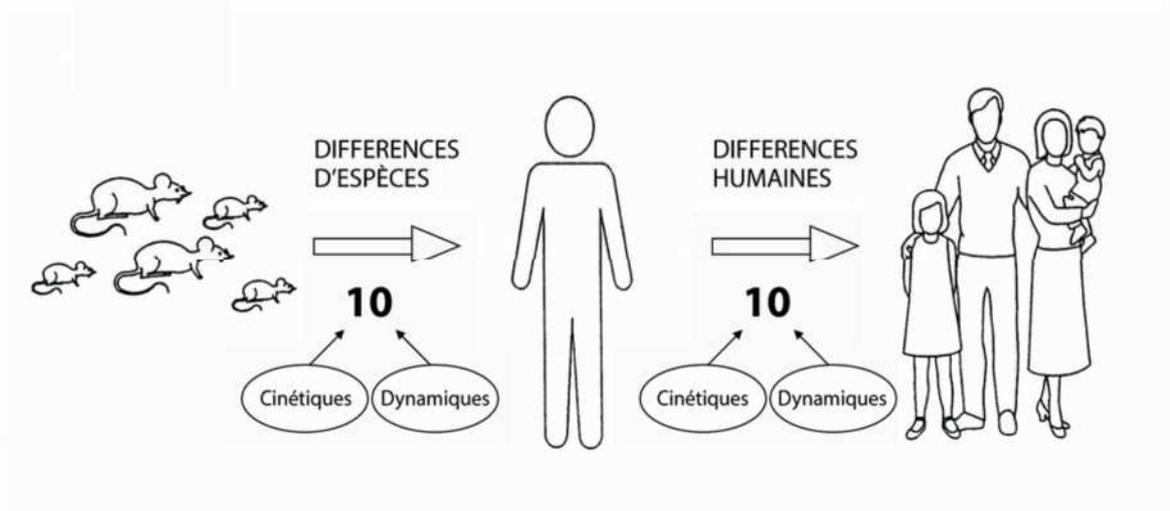


Figure 4.1 : Variation de facteur de sécurité entre les espèces et les individus [1].

### 3.5.4. Sélection de l'espèce animale à tester

La sélection de l'espèce animale pour les études toxicologiques a été pour longtemps un sujet de débat. L'espèce idéale doit avoir une courte durée de vie, des taux de reproduction élevés et une large taille de la portée afin d'optimiser la sensibilité de détection des effets adverses. De plus elle doit avoir un métabolisme et une sensibilité comparable à ceux de l'espèce humaine [74].

Malheureusement de telles espèces n'existent pas, et par la suite les études de toxicité sont effectuées sur l'espèce la plus appropriée pour l'effet sous investigation. D'une façon générale, les rongeurs sont considérés comme étant des bons modèles expérimentaux malgré qu'ils présentent des différences avec l'espèce humaine de point de vue biochimique et physiologique, et sont alors utilisés dans la majorité des études chroniques pour des raisons de praticabilité [74]. En fait la compréhension croissante des mécanismes toxiques a permis de reconnaître parmi les effets adverses observés chez les rongeurs ceux qui sont pertinents à l'espèce humaine. Par ailleurs l'expérience croissante avec ces espèces a permis de mieux reconnaître parmi les changements mineurs qui sont détectés en expérimentation ceux qui ont une signification clinique. Des données émanant des essais conduits chez des espèces autres que les rongeurs sont indispensables pour optimiser l'identification du danger. Le choix de cette seconde espèce va dépendre de l'objectif des investigations. Bien qu'il n'existe pas de directives indiquant le genre d'espèce à utiliser dans les différents essais de toxicité, la pratique courante utilise :

- Les rats et les chiens pour les études de toxicité à court terme et subchronique.
- Les rats et les souris pour les études de toxicité chronique et de cancérogénèse.
- Les rats et les lapins pour les études de toxicité de la reproduction et du développement [77].

Le rat qui est le mammifère le plus fréquemment utilisé en expérimentation animale, il compte pour à peu près 20 % du nombre total de mammifères utilisés dans la recherche. Le rat étant bien plus facile à élever, il est plus proche génétiquement de l'homme, il est devenu l'une des espèces les plus utilisées pour l'expérimentation animale.

Le rat est le modèle expérimental le plus utilisé pour tester la toxicité des produits chimiques. L'incidence des malformations spontanées est moins importante que chez la souris ou le lapin, deux autres espèces couramment utilisées en laboratoire. [78].

## MATERIEL ET MÉTHODES

Cette partie présente l'ensemble du matériel, des réactifs, et des méthodes analytiques utilisés pour la réalisation de notre étude.

Notre expérimentation s'est déroulée au niveau de plusieurs laboratoires :

- Les analyses de l'eau ont été réalisées au niveau de laboratoire de l'ANRH (l'Agence Nationale de Ressources Hydrauliques) –El Soumaa Blida.
- Les analyses physicochimiques de l'aliment destiné aux rats ont été réalisées au niveau de laboratoire de l'ITELV (Institut Technique des Élevages) –Baba Ali, Alger.
- L'élevage des rats et l'expérimentation animale a été opéré au niveau de la station d'expérimentation animale de la faculté des Sciences de la nature et la vie de l'université Blida 1.
- Les analyses biochimiques et hématologiques du sang des rats ont été faites au niveau de laboratoire médical de l'hôpital civil de Hadjout, Tipaza
- Les coupes histologiques des organes des rats ont été réalisées au niveau de laboratoire de l'anatomie pathologique de l'ENV (Ecole Nationale de Vétérinaire) d'El Harrach, Alger.

### 1. Matériel

#### 1.1. Matériel biologique

##### 1.1.1. L'eau

L'eau utilisée pour l'alimentation des rats pendant toute l'expérimentation est une eau potable de robinet, nous avons utilisé uniquement l'eau potable de robinet de la commune Ouled Yaich -Blida pendant toute l'expérimentation.

### 1.1.2. Aliment destiné aux rats et la spiruline

Dans notre étude expérimentale nous avons utilisé deux types de régimes alimentaires : un sans spiruline et l'autre avec spiruline.

#### ➤ Régime sans spiruline

Les rats sont nourris par un aliment équilibré destiné aux rats sous forme de tourteaux agglomérés ou bouchons (figure 4.1), c'est un mélange de maïs, son, remoulage, soja, CMV (Complexe Multi-vitaminique), fabriqué par une société à responsabilité limitée (SARL) « la production locale » Bouzaréah-Alger, (date de fabrication le 20/11/2012).



Figure 4.1 : Aliment de rats sans spiruline (photo originale).

#### ➤ Régime enrichi en spiruline

Les rats sont nourris par le même aliment cité ci-dessus, auquel est ajouté 1% de spiruline sèche (1 g de spiruline pour chaque 99 g d'aliment) (figure 4.2), l'opération d'enrichissement de l'aliment par la spiruline sèche a été réalisée par le fabricant de l'aliment selon le même processus technologique.



Figure 4.2 : Aliment de rats enrichi en spiruline (photo originale).

### 1.1.3. La spiruline

La spiruline utilisée pour l'enrichissement de l'aliment des rats appartient à l'espèce *Spirulina platensis* commercialisée sous forme des petites paillettes sèches obtenues à partir de la France, fabriquée par la société Biovie (Figure 4.3).



Figure 4.3 : Spiruline sèche (photo originale).

### 1.1.4. Les animaux de l'expérimentation

Toutes les expériences de cette étude ont été réalisées sur des rats femelles adultes *Rattus norvegicus* de la souche «Wistar» (figure 4.4) aux caractéristiques suivantes :

- Nombre : 18 rats femelles + 4 rats males pour l'accouplement.
- Age : 3 mois (12 semaines).
- Poids : poids corporel moyen: 213 g pour les femelles et 315 g pour les males.
- Dénomination : Ico : WISTAR (IOPS AF/Han).
- Origine : Le pays d'origine de la souche c'est la Nouvelle Zélande, obtenue à partir de l'animalerie du SAIDAL CRD d'El-Harrach Alger (le Centre de Recherche et de Développement) où se réalise l'élevage et l'accouplement selon des normes internationales.

Ce sont des rats de laboratoire sains et normalisés, le rat Wistar est un modèle très intéressant pour les études de la toxicité.

- Alimentation : L'alimentation et l'eau ont été fournies de tel sort que les animaux avaient libre accès à l'eau et à l'aliment.
- Les cages : Durant toute la période d'expérimentation les rats ont été gardés dans des cages en plastique de 40/25 cm, munies d'un couvercle en grillage métallique sur lequel sont déposés l'aliment et l'eau.



Figure 4.4 : Rats femelles (*Rattus norvegicus*) de la souche «Wistar»  
(photo originale).

## 1.2. Métaux lourds

Les métaux lourds utilisés pour cette étude sont le mercure (Hg), le cadmium (Cd) et le plomb (Pb). Pour la préparation des solutions aqueuses renfermant un mélange de ces éléments toxiques pour l'administration orale aux rats, nous avons choisi les composés les plus solubles dans l'eau à savoir :

### 1.2.1. Le Chlorure de mercure (II) $HgCl_2$

C'est un solide cristallin blanc, il est l'une des formes les plus toxiques du mercure parce qu'il est plus soluble dans l'eau que la plupart des autres composés du mercure. Leur solubilité dans l'eau à 20 °C est de 74 g/L, Le chlorure mercurique est très toxique, mutagène, tératogène, toxine reproductrice, neurotoxique et néphrotoxique. La toxicité orale (DL50): 1 mg/kg (Rat) [107].

Nous avons utilisé un flacon de 500 g obtenu à partir de département de chimie industrielle fabriqué en Belgique par JANSSEN CHIMICA, distribué par ACROS, numéro de lot : 74454/1.

### 1.2.2. Le Chlorure de cadmium $\text{CdCl}_2$

C'est un composé inorganique constitué de cadmium et de chlore. C'est un solide blanc hygroscopique très soluble dans l'eau, leur solubilité dans l'eau à 20 °C est de 1,4 kg/L, Le chlorure de cadmium est une substance très toxique et dangereuse pour l'environnement. Il est cancérogène, mutagène et peut avoir des effets sur la reproduction. La toxicité orale (DL50): Aiguë: 665 mg/kg (Rat) [108].

Nous avons utilisé un flacon de 250 g obtenu a partir de département de chimie industrielle fabriqué en Belgique par JANSSEN CHIMICA sous la forme  $\text{CdCl}_2(5\text{H}_2\text{O})$ , numéro de lot : 71477/2.

### 1.2.3. Acétate de plomb(II) $\text{PbC}_4\text{H}_6\text{O}_4$

C'est un composé de plomb et l'acide citrique, sous forme des cristaux blancs de gout sucré, soluble dans l'eau, leur solubilité dans l'eau à 20 °C est de 456 g/L. Peut être fatal par ingestion, Irritant. Les composés solubles de plomb comme l'acétate de plomb sont les plus dangereux. Peut affecter les systèmes reproducteurs de la femme et de l'homme et peut être tératogène, neurotoxine. Les organes atteints sont : sang, système nerveux central, foie, reins, système gastro-intestinale. La toxicité orale (DL50): Aiguë: 4665 mg/kg (Rat) [109].

La quantité utilisée pendant notre étude a été prélevé à partir d'un bidon métallique de 5 kg, obtenu à partir de département de chimie industrielle fabriqué en France par PROBABO, numéro de lot : 78/37, numéro de code 26481.

## 2. Méthodes d'analyses

La réalisation de notre étude s'est déroulée autour de trois étapes majeures :

- La caractérisation du régime alimentaire (aliment et l'eau) destiné aux rats qui a induit une :
  - ✓ Caractérisation de l'eau potable de robinet utilisée : conductivité, pH, bicarbonate, Ca et Mg, chlorure, Na, K et l'extrait sec ;
  - ✓ Caractérisation de l'aliment sans spiruline et enrichi en spiruline : détermination de taux des protéines, la matière grasse, calcium et phosphore ;
  
- La réalisation de l'expérimentation animale sur des rats Wistar femelles pour la détermination de l'effet de la spiruline sur la toxicité orale des métaux lourds (Hg, Cd et Pb) par :
  - ✓ Administration par voie *per os* (orale) des doses de métaux lourds (Hg, Cd et Pb) sur deux groupes de rats dont le régime alimentaire est avec ou sans spiruline pendant 7 semaines ;
  - ✓ Suivi de l'effet des métaux lourds et celui de la spiruline sur la reproduction au cours des 3 dernières semaines de l'expérimentation animale ;
  
- Sacrifice des rats après les dix semaines d'expérimentation et l'évaluation de l'effet de la spiruline sur la toxicité des métaux lourds par :
  - ✓ Dosage des paramètres biochimiques et hématologiques du sang des rats : Urée, Créatinine, Acide urique, Cholestérol total, Triglycérides et FNS ;
  - ✓ Réalisation des coupes histologiques dans les organes vitaux des rats au niveau du foie, les reins et les poumons.

## 2.1. Analyses physicochimiques de l'eau

### 2.1.1. Détermination de la conductivité électrique

#### ➤ Principe

La conductivité mesure la capacité d'une solution à conduire le courant entre deux électrodes à 20°C. La plupart des matières dissoutes se trouvent sous forme d'ions chargés électriquement. La mesure de la conductivité permet donc d'apprécier la quantité de sels dissous dans les solutions [79].

#### ➤ Mode opératoire

Pour la mesure de la conductivité électrique, il suffit de:

- Plonger la pointe de l'électrode du conductimètre électrique dans la solution à analyser.
- Lire directement sur l'écran la valeur de la température en °C et la conductivité électrique en  $\mu\text{s/cm}$  ou  $\text{ms/cm}$ .

### 2.1.2. Détermination du pH

#### ➤ Principe

C'est la détermination en unité pH de la différence de potentiel d'hydrogène existant entre deux électrodes en verre plongées dans une solution aqueuse (l'eau) (NF V 05-108, 1970).

#### ➤ Mode opératoire

Pour la mesure du pH, il suffit de:

- Plonger l'électrode du pH-mètre dans la solution à analyser (l'eau).

#### ➤ Expression des résultats

Lire directement sur l'écran la valeur de la température en °C et la valeur de pH sans unité.

### 2.1.3. Dosage des Bicarbonates $\text{HCO}_3^-$

#### ➤ Principe

Les bicarbonates n'existent si le pH est compris entre 4,4 et 8,3. Au cours d'un dosage en parallèle d'une mesure de pH, à quel moment ces ions sont encore présents ou non dans l'échantillon de l'eau [79].

#### ➤ Mode opératoire

Si pH est compris entre 4,4 et 8,3 :

Ajouter à la burette  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 0,01N jusqu'à obtenir pH = 4.4; noter le volume d'acide  $V_2$  mL versé.

Si  $V_2 < 5$  mL prendre 40 mL de PE (prise d'essai).

Si  $V_2 > 10$  mL prendre 10 mL de PE.

#### ➤ Expression des résultats

Si pH est compris entre 4,4 et 8,3.

Il n'y a ni carbonates ni  $\text{OH}^-$  dans l'échantillon, il y que les bicarbonates

$$\text{HCO}_3 \text{ mé/l} = \frac{(V_2 \text{ mL} \times 0,01 \times 100)}{\text{PE mL}}$$

$$\text{HCO}_3 \text{ mg/L} = \text{HCO}_3 \text{ mé/L} \times 61$$

**mé/L** : Milli-équivalent.

**61** : la masse molaire de bicarbonate.

### 2.1.4. Dosage du Calcium $\text{Ca}^{2+}$ et Magnésium $\text{Mg}^{2+}$

#### ➤ Principe

Le dosage se fait par complexométrie, le sel disodique de l'acide Ethylène Diamino Tétra Acétique (EDTA) cristallisé avec  $\text{H}_2\text{O}$ , appelé aussi compléxon ou versénate forme avec un nombre de cation des complexes dont la stabilité dépend essentiellement du pH [79].

#### ➤ Mode opératoire

Titre de de l'acideE thylène Diamino Tétra Acétique (EDTA)

- Le dosage de l'E.D.T.A s'impose à chaque fois que le remplissage du flacon doseur est fait.

- On prépare une solution de  $\text{CaCO}_3$  à 1 g/L (attaque de 1 g de  $\text{CaCO}_3$  par Hcl dilué puis ajuster à 1 litre par de l'eau distillée. Le  $\text{CaCO}_3$  doit

avoir été séché à l'étuve puis refroidi au dessiccateur ). On prélève 10 mL qui seront dosés en même temps que les échantillons. Cette solution contient 20 mé/L de  $\text{Ca}^{2+}$ .

- Les PE ayant été placés dans des béchers de 50 mL on y ajoute systématiquement 2 mL de Tampon (Ca/Mg) et 2 mL de NaOH (Ca) et une pincée d'indicateur coloré; la solution prend une teinte rose (Ca/Mg) et rouge (Ca).

- La solution étalon de  $\text{Ca}^{2+}$  et les échantillons ainsi préparés sont alors traités de manière identique. L'E.D.T.A étant placé dans la burette, on verse jusqu'au virage du rose au bleu en maintenant une agitation dans le bécher. On notera soigneusement le volume  $V_1$  d'E.D.T.A nécessaire pour faire virer la solution étalon de  $\text{Ca}^{2+}$  et les volumes  $V_2$  d'E.D.T.A nécessaire pour faire virer les échantillons.

➤ Expression des résultats

1. Calcul de la normalité de l'E.D.T.A :

10 ml à 20 mé/L de Calcium ont été dosés par  $V_1$  d'E.D.T.A

$$N(\text{E. D. T. A}) \text{ mé/L} = \frac{(20 \times 10)}{V_1} = \frac{200}{10}$$

**N** : Le titre.

2. Teneur en Calcium et Magnésium des échantillons :

$$(\text{Ca/Mg}) \text{ mé/L} = \frac{N(\text{E. D. T. A}) \times V_2}{\text{PE mL}}$$

$$(\text{Ca/Mg}) \text{ mg/L} = (\text{Ca/Mg}) \text{ mé/L} \times N(\text{E. D. T. A}) \text{ mé/L}$$

3. Teneur en Calcium des échantillons :

$$\text{Ca mé/L} = \frac{N(\text{E. D. T. A}) \times V_2}{\text{PE mL}}$$

$$\text{Ca mg/L} = \text{Ca mé/L} \times N(\text{E. D. T. A}) \text{ mé/L}$$

4. Teneur en Magnésium des échantillons :

$$\text{Mg mé/L} = (\text{Ca/Mg}) \text{ mé/L} - \text{Ca mé/L}$$

$$\text{Mg mg/L} = (\text{Ca/Mg}) \text{ mg/L} - \text{Ca mg/L}$$

### 2.1.5. Dosage des chlorures

#### ➤ Principe

Les chlorures, en présence du thiocyanate mercurique et de l'alun ferrique donnent en milieu nitrique acide un complexe coloré orange susceptible d'un dosage colorimétrique par un spectrophotomètre (à la longueur d'onde de 470 nm) [79].

#### ➤ Mode opératoire

- On place les PE (prise d'essai) 5 ml dans des erlens de 50 mL.
- Les PE des solutions étalons, le témoin (H<sub>2</sub>O) et les échantillons sont alors traités de manière identique à savoir :
- On ajoute dans l'ordre 1 mL de la solution de thiocyanate mercurique préalablement diluée au 1/3 puis 1 mL de la solution nitrique d'alun ferrique également diluée au 1/6.
- On agite vigoureusement les erlens pour uniformiser la coloration qui apparaît et on laisse au repos pendant ½ heure.
- On effectue les lectures au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 470 nm en réglant le zéro avec le témoin.

#### ➤ Expression des résultats

Lire directement sur l'écran la valeur de l'absorbance. La courbe d'étalonnage donne directement la teneur en chlorures en mg/L.

### 2.1.6. Dosage du sodium Na<sup>+</sup> et potassium K<sup>+</sup>

#### ➤ Principe

Le dosage se fait par photométrie de flamme, les ions en solution sont portés au moyen d'une flamme de température convenable à un niveau énergétique supérieur à la normale (on dit que les atomes sont excités par la flamme). Libérés de la flamme, ils restituent l'énergie acquise en émettant une radiation caractéristique de l'élément. On pulvérise donc au moyen d'un gicleur, la solution à doser dans une flamme de température déterminée par

l'élément que l'on recherche. On sélectionne la radiation attendue au moyen d'un filtre. L'intensité de la radiation est proportionnelle à la concentration de l'élément présent dans la solution. On établit donc une gamme étalon pour chaque élément dosé et l'on s'y réfère pour déterminer une concentration inconnue. Le sodium et le potassium sont dosés à partir de la même solution étalon à des sensibilités différentes du photomètre de flamme [79].

➤ Mode opératoire

- Préparer le plateau de l'échantillonneur et placer les tubes des échantillons d'eau à analyser et la gamme d'étalonnage.
- Allumer l'onduleur, allumer l'échantillonneur et l'auto analyseur, ouvrir la bouteille de gaz, allumer le photomètre avec on/off, et ouvrir le compresseur.
- Tremper le tuyau du nébulisateur dans de l'eau distillée pour rincer le système.
- Tremper le tuyau du réactif dans le Latium.
- Quand la coloration de la flamme devient rose, lancer l'analyse du blanc en appuyant sur le bouton set du photomètre.
- Quand le photomètre affiche cal et zéro on lance l'analyse par le logiciel : utilisation du logiciel : flow access.
- Cliquer sur l'icone access.
- L'analyse se fait automatiquement par le système.

➤ Expression des résultats

La courbe d'étalonnage donne directement la teneur en sodium  $\text{Na}^+$  et potassium  $\text{K}^+$  en mg/L. Lire directement sur l'écran la valeur en mg/L.

2.1.7. Détermination de résidu sec

➤ Principe

La prise d'essai de l'eau est soumise à la dessiccation, la perte de masse est déterminée par pesée [79].

➤ Mode opératoire

Tarer, à 0.5 mg près, un récipient métallique (muni de couvercle).

Peser, à 1 mg près dans le récipient taré à 100 mL de l'échantillon de l'eau est reparti uniformément la prise d'essai, placer le récipient dans l'étuve préalablement chauffée à 180°C, le couvercle est élevé, pour éviter que la température de l'étuve ne descende trop.

- Introduire le récipient en un temps minimum.
- Laisser sécher à une température de 180°C à l'étuve durant 4 heures.
- Remettre le couvercle sur le récipient, retirer celui-ci de l'étuve et laisser refroidir durant 45 minutes dans un dessiccateur au gel de silice et peser à 1 mg près.

➤ Expression des résultats

Soit :

$$RS \% = \frac{(M1 - M2)}{P} \times 100$$

**RS** : Résidu sec.

**M1** : Masse de la capsule + le résidu sec

**M2** : Masse de la capsule

**P** : Masse de la prise d'essai

2.2. Analyses physico-chimiques de l'aliment des rats

Le contrôle physico-chimique de l'aliment est réalisé par la mesure du : taux de protéines, la matière grasse, le calcium et le phosphore.

2.2.1. Détermination de taux des protéines

➤ Principe

C'est la détermination conventionnelle de la teneur en protéines brutes à partir de la teneur en azote, dosée selon KJELDAHL.

L'azote total est dosé par titrimétrie, après minéralisation et distillation. L'échantillon est minéralisé par voie humide, la solution acide est alcalisée par une solution d'hydroxyde de sodium. L'ammoniac libéré est entraîné par distillation et recueilli dans une quantité déterminée d'acide sulfurique, dont l'excès est titré par une solution d'hydroxyde de sodium NaOH (NA 652, 1994).

➤ Mode opératoire

1. Prise d'essai : introduire dans les matras environ 0,5 à 1 g de l'échantillon suivant la teneur présumée en azote et le degré de l'homogénéisation du produit.
2. Minéralisation : placer les matras sur le dispositif de chauffage, après avoir ajouter environ 1 à 2 g de catalyseur et 12,5 mL d'acide sulfurique concentré, chauffer doucement en agitant de temps en temps. Augmenter la température progressivement jusqu'à ce que le liquide devient limpide et de coloration verte stable. Poursuivre le chauffage environ 2 heures et laisser refroidir les matras. Compléter en ajoutant 100 mL d'eau distillée.
3. Distillation : mettre les matras dans l'appareil à distillation. Alcaliser le milieu en introduisant lentement dans le matras environ 50 mL de solution NaOH (soude à 47%), il se produit un échauffement notable du produit, peser 333 g de NaOH puis ajouter de l'eau distillée préalablement refroidie, puis mélanger avec le verre en verre puis mettre sur l'agitateur pour avoir un mélange homogène dilué avec l'eau distillée (333 g de NaOH dans 1L d'eau distillée). L'entraînement de l'ammoniac commence peu après. L'ammoniac libéré par l'alcalisation est distillé. Le distillat est recueilli dans un erlenmeyer contenant 20 ml de la solution absorbante (solution d'acide borique et l'indicateur : rouge de méthyle + vert de bromocrésol). Poursuivre la distillation jusqu'à récupération d'environ 100 mL de distillat.
4. Titrage : le titrage doit être effectué aussi rapidement après la distillation par une solution d'acide sulfurique à 0,1 N jusqu'à persistance du point de titrage. Un essai à blanc doit être inclus dans chaque série de dosage.

➤ Expression des résultats

La teneur en azote total exprimé en gramme d'azote pour 100 g d'échantillon est donnée par la formule suivante:

$$\text{Azot total \%} = \frac{(V1 - V0) \times 14}{m} \times 100$$

Où :

**V1** : Volume en millilitre de la solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilisée pour la prise d'essai.

**V0** : Volume en millilitre de la solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilisée pour l'essai à blanc.

**m** : La masse en gramme de la prise d'essai. Le résultat de la détermination est exprimé en protéine après multiplication de la teneur en azote total par un coefficient approprié correspondant à la position du produit 6,25.

### 2.2.2. Dosage de la matière grasse

#### ➤ Principe

Le solvant organique (extracteur) est très peu polaire, il extrait les triglycérides et les acides gras libres à chaînes longues (N A 654, 1994).

#### ➤ Mode opératoire

A l'aide un appareil de dosage de la matière grasse (système Soxhelt), nous pesons 1 g de l'échantillon (P<sub>0</sub>) dans une cartouche en cellulose et nous mettons 150 mL d'éther de pétrole dans un ballon préalablement lavé séché et tiré (P<sub>1</sub>).

La cartouche est placée dans le système Soxhelt, le ballon est placé dans le bain-marie qui est réglé à une température égale à celle du degré d'ébullition du solvant (95 °C).

L'extraction se fait par ébullition du solvant et condensation de ses vapeurs par un réfrigérant, le système de siphonage assure le passage des gouttelettes de la matière grasse vers le ballon.

Cette extraction dure environ 6 heures, et l'éther peut être récupéré avant la fin de l'opération.

Après les 6 heures, les ballons sont retirés et mis dans une étuve réglée à la même température de celle du bain-marie afin d'évaporer l'excès d'éther.

Le ballon est ensuite refroidi jusqu'à poids constant dans un dessiccateur et pesé de nouveau (P<sub>2</sub>).

➤ Expression des résultats

Le pourcentage de la matière grasse est calculé par différence de pesée du ballon :

$$\text{MGT \%} = \frac{(P_2 - P_1)}{P_0} \times 100$$

Où :

**P<sub>0</sub>** : La prise d'essai de l'échantillon.

**P<sub>1</sub>** : Poids du ballon.

**P<sub>2</sub>** : Poids du ballon contenant l'extrait gras.

2.2.3. Dosage du calcium

➤ Principe

Incinération d'une prise d'essai, puis traitement de ces cendres à l'acide chlorhydrique et précipitation du calcium sous forme d'oxalate de calcium. Dissolution du précipité dans l'acide sulfurique et titrage par l'acide oxalique formé à l'aide d'une solution titrée de permanganate de potassium (N A 653, 1994).

➤ Mode opératoire

Après l'incinération totale de la prise d'essai dans un four à moufle à 550 °C ± 25 °C pendant 4 heures. Transfer les cendres dans un bécher; ajouter 40 mL d'acide chlorhydrique et 60 mL d'eau distillée et quelques gouttes d'acide nitrique. Porter à ébullition et l'y maintenir 30 minutes. Refroidir et transvaser la solution dans une fiole de 250 mL, rincer et compléter au trait de jauge avec l'eau distillée. Prélever à l'aide d'une pipette une partie aliquote contenant de 20 à 40 mg de calcium, selon la teneur présumée en calcium et la verser dans un bécher de 250 mL. Ajouter 1 mL d'acide citrique et 5 ml de solution chlorure d'ammonium, diluer à environ 100 mL avec de l'eau portée à ébullition, ajouter quelques gouttes de solution de vert de bromocrésol et 30 mL de solution d'oxalate d'ammonium chaude. Neutraliser très lentement avec l'ammoniaque en agitant constamment, jusqu'à obtention d'un pH à 4,4 à 4,6, laisser décanter une nuit.

Filtrer dans un creuset filtrant porosité 4, laver le bécher et le creuset à l'eau jusqu'à l'élimination complète de l'excès d'oxalate d'ammonium. Prendre 50 mL d' H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> chaude et rincer le creuset pour récupérer le dépôt qui doit être mis dans l'eren. Compléter le rinçage du creuset à l'eau chaude ensuite compléter le

volume à 100 mL. Amener la température de la solution à 70- 80°C, titrer la solution en utilisant le permanganate de potassium (0,1N) jusqu'à obtention d'une couleur rose.

➤ Expression des résultats

Où :

$$\text{Ca \%} = \frac{(V \times 2,004)}{P} \times 100$$

**V** : Le volume de permanganate de potassium (0,1N).

**P** : La prise d'essai.

#### 2.2.4. Dosage du phosphore

➤ Principe

L'échantillon est minéralisé, soit par voie sèche (pour les aliments organiques), soit par voie humide (pour les composés minéraux et les aliments liquides) et mis en solution acide. La solution est traitée par le réactif vanado-molybdique. La densité optique de la solution jaune ainsi formée est mesurée au spectrophotomètre à 430 nm (N A 657, 1994).

➤ Mode opératoire

1. Préparation de la solution : selon la nature de l'échantillon, préparer une solution comme indiqué en 1.1 ou 1.2 :

1.1. Cas général : peser, à 1 mg près, 1 g ou plus de l'échantillon. Introduire la prise d'essai dans un matras de Kjeldahl, ajouter 20 mL d'acide sulfurique , agiter pour imprégner complètement la matière d'acide et éviter qu'elle n'adhère aux parois du ballon, chauffer et maintenir pendant 10 minutes à ébullition. Laisser refroidir légèrement, ajouter 2 mL d'acide nitrique, chauffer doucement, laisser refroidir légèrement, ajouter de nouveau un peu d'acide nitrique et porter à ébullition. Répéter ces opérations jusqu'à obtention d'une solution incolore. Refroidir, ajouter un peu d'eau, transvaser le liquide dans un ballon jaugé de 500 mL en rinçant le matras à l'eau chaude. Laisser refroidir, compléter au volume avec de l'eau, homogénéiser et filtrer.

1.2.

1.2. Échantillon contenant des matières organiques et exemptes de dihydrogénophosphates de calcium et de magnésium :

Peser 1 mg de l'échantillon dans un creuset à incinération. Mélanger intimement la prise d'essai à 1 g de carbonate de calcium. Calciner au four à moufle à  $550^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  jusqu'à obtention de cendres blanches ou grises (une petite quantité de charbon ne gêne pas).

Transvaser les cendres dans un bécher de 250 mL. Ajouter 20 mL d'eau et de l'acide chlorhydrique jusqu'à cessation de l'effervescence. Ajouter ensuite 10 mL d'acide chlorhydrique en excès. Porter le bécher sur un bain de sable et évaporer à sec pour insolubiliser la silice. Reprendre le résidu par 10 mL d'acide nitrique et faire bouillir pendant 5 minutes sur le bain de sable, sans évaporer à sec. Transvaser le liquide dans un ballon jaugé de 500 mL en rinçant le bécher à plusieurs reprises à l'eau chaude. Laisser refroidir, compléter au volume avec de l'eau, homogénéiser et filtrer.

2. Développement de la coloration et mesure de la densité optique : Diluer une partie aliquote du filtrat obtenu en 1.1 pour obtenir une concentration en phosphore atteignant au maximum  $40\ \mu\text{g/mL}$ . Introduire 10 mL de cette solution dans un tube à essai et y ajouter 10 mL du réactif vanado-molybdique. Homogénéiser et laisser reposer 10 minutes au moins à la température de  $20^{\circ}\text{C}$ . Mesurer la densité optique au spectrophotomètre à 430 nm par comparaison avec une solution obtenue par addition de 10 mL du réactif vanado-molybdique à 10 mL d'eau.

3. Courbe d'étalonnage : Préparer à partir de la solution étalon des solutions contenant respectivement 5, 10, 20, 30 et  $40\ \mu\text{g}$  de phosphore par mL. Prélever 10 mL de chacune de ces solutions et y ajouter 10 ml du réactif vanado-molybdique. Homogénéiser et laisser reposer 10 minutes au moins à la température de  $20^{\circ}\text{C}$ . Mesurer les densités optiques dans les conditions indiquées en 2.

Tracer la courbe d'étalonnage en portant en ordonnée les valeurs de la densité optique et en abscisse les quantités correspondantes au phosphore. La courbe est linéaire pour les concentrations comprises entre 0 et  $40\ \mu\text{g/mL}$ .

➤ Expression des résultats

Déterminer la quantité de phosphore de la prise d'essai en se référant à la courbe d'étalonnage. Exprimer le résultat en pour cent de l'échantillon.

2.3. Expérimentation animale

2.3.1. Période d'acclimatation et administration des métaux lourds

Avant toute expérimentation et dès leur arrivée à la station d'expérimentation animale de la faculté des sciences de la nature et la vie de l'université de Blida 1 le 28/03/2013, les rats sont soumis à une période d'acclimatation pendant deux semaines (15 jours) à la température ambiante et un cycle de lumière/obscurité alterné pour que les rats s'adaptent aux conditions de l'environnement et l'alimentation.

- La 1<sup>ère</sup> semaine d'acclimatation : Tous les rats, sans divisés en lots sont soumis à un régime alimentaire normal, l'aliment consommé est sans spiruline.
- La 2<sup>ème</sup> semaine d'acclimatation : Les 18 rats sont divisés en 3 lots à raison de 6 rats par lots d'une façon que les trois lots ont presque le même poids  $\pm 10$  g jusqu'à 20 g, deux lots de rats sont nourris par un régime alimentaire normal et les rats de troisième lot sont nourris par un régime enrichi par la spiruline à 1%.

Le poids corporel et la quantité d'aliment ingérée par les rats étaient pesés une fois chaque semaine.

➤ Le début d'expérimentation

- Le lot A (Sans spiruline) : chaque rat des 6 rats est placé d'une cage individuelle et nourri par un régime alimentaire normal sans spiruline. Ils sont traités par des doses de métaux lourds sous forme d'une solution aqueuse d'un mélange de ( $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_2$  et  $\text{PbC}_4\text{H}_6\text{O}_4$ ) selon le tableau 4.1, la solution est placée dans les bouteilles (biberons) de l'eau des animaux (Figure 4.5).

- Le lot B (Avec spiruline) : chaque rat des 6 rats est placé d'une cage individuelle et nourri par un régime alimentaire enrichi de la spiruline à 1%. Ils sont traités par des doses de métaux lourds sous forme d'une solution aqueuse d'un mélange de ( $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_2$  et  $\text{PbC}_4\text{H}_6\text{O}_4$ ) selon le tableau 4.1, la solution est placée dans les bouteilles (biberon) de l'eau des animaux (Figure 4.5).
- Le lot Témoin : les témoins sont placés 3 rats par cage, nourri par un régime alimentaire normal sans spiruline et une eau de boisson normale sans aucune dose de métaux lourds pendant toute la durée de l'expérimentation (Figure 4.5).

Le diagramme suivant illustre d'une façon globale la démarche suivie pour la réalisation de cette étude :

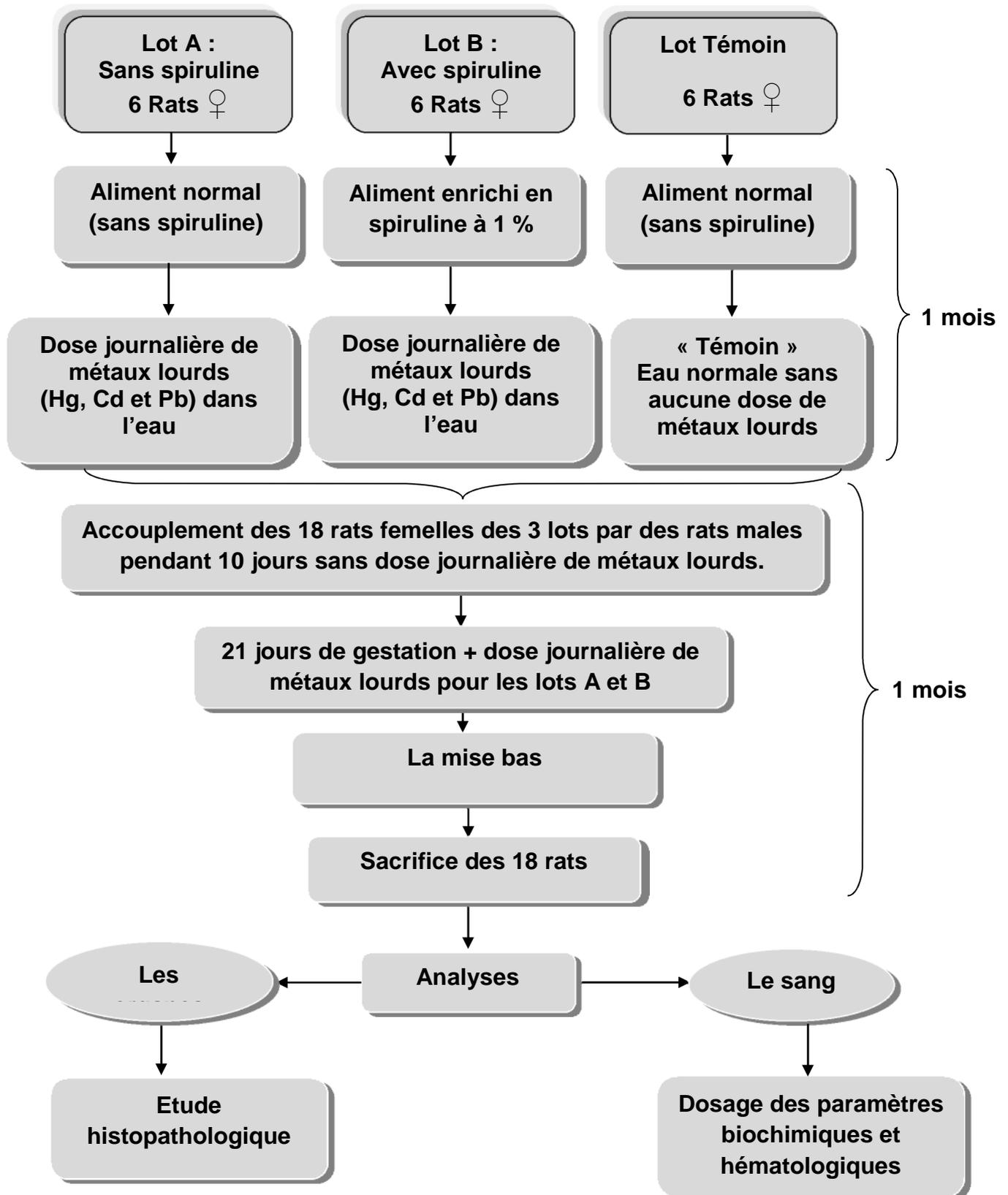


Figure 4.5 : Schéma général de l'étude expérimentale.

Le tableau suivant montre les doses de métaux lourds administrées sur les rats pendant les 7 semaines d'expérimentation

Tableau 4.1 : Doses des métaux lourds administrées sur les rats pendant les 7 semaines d'expérimentation.

	Les doses en mg/rat/jr pendant les 7 semaines						
	1 ère	2 ème	3 ème	4 ème	5 ème	6 ème	7 ème
<b>HgCl<sub>2</sub></b>	0,005	0,01	0,02	0,10	0,15	0,16	0,20
<b>CdCl<sub>2</sub></b>	1	2	50	32	100	100	100
<b>PbC<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub></b>	5	14	100	60	30	100	100

➤ Préparation des solutions des métaux lourds

Le choix des doses de chaque métal est en fonction de sa DJT (Dose Journalière Tolérable) et la DL50 (Dose létale 50) les dose administrées sur les rats doivent être entre la DJT et la DL50 pour avoir des effets toxiques sans avoir la mort des rats, les doses administrées se change selon le poids des rats et la quantité de l'eau consommée.

Exemple : Tableau 4.2 : Les valeurs de la DJT et la DL50 des métaux lourds [107; 108 et 109].

	DJT	DL50
<b>HgCl<sub>2</sub></b>	0 ,00071 mg/kg/j	1 mg/kg/j
<b>CdCl<sub>2</sub></b>	0,001 mg/kg/j	665 mg/kg/j
<b>PbC<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub></b>	0,0036 mg/kg/j	4665 mg/kg/j

4665 mg → 1000  
 X → 225 g (rat)  
 $X = 4665 \times 225 / 1000$   
**X = 1049 mg/Rat/j**

➤ Tableau 4.3 : Les valeurs de la DJT et la DL50 selon le poids des rats = 225 g.

	DJT	DL50
<b>Hgcl<sub>2</sub></b>	0 ,00016 mg/rat/j	0,225 mg/rat/j
<b>Cdcl<sub>2</sub></b>	0,000225 mg/rat/j	149 mg/rat/j
<b>PbC<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub></b>	0,00081 mg/rat/j	1049 mg/rat/j

1049 mg → 25 mL  
 X → 1000 mL  
 $X = 1049 \times 1000 / 25$   
**X = 41960 mg/L**

➤ Tableau 4.4 : Les valeurs selon la quantité d'eau consommé /rat/Jour = 25 mL.

	<b>DJT</b>	<b>DL50</b>
<b>HgCl<sub>2</sub></b>	0,0064 mg/L	9 mg/L
<b>CdCl<sub>2</sub></b>	0,009 mg/L	5960 mg/L
<b>PbC<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub></b>	0,032 mg/L	41960 mg/L

➤ Tableau 4.5 : Les doses de métaux lourds administrées sur les rats.

	<b>DJT</b>	<b>LA DOSE</b>	<b>DL50</b>
<b>Pb</b>	0,032 mg/L	<b>5 mg/rat/j</b> <b>200 mg/l</b>	41960 mg/L
<b>Hg</b>	0,0064 mg/L	<b>0,005 mg/rat/j</b> <b>0,2 mg/l</b>	9 mg/L
<b>Cd</b>	0,009 mg/L	<b>1 mg/rat/j</b> <b>40 mg/l</b>	5960 mg/L

### 2.3.2. L'accouplement, gestation et mise bas

Après les 4 semaines d'administration orale des doses de métaux lourds sur les lots A et B, et dans le but d'étudier l'effet de la spiruline contre la toxicité des métaux lourds sur la reproduction, toutes les 18 rats femelles des 3 lots ont subi un accouplement par des rats Wistar mâles adultes (poids moyen = 315 g), sains et en bonne santé (n'ont pas subi un traitement par les métaux lourds), la durée de l'accouplement est de 10 jours pour s'assurer que toutes les femelles sont fécondées après 2 cycles d'ovulation, sachant que le cycle des rats femelles est chaque 4 jours. Pendant la durée d'accouplement on arrête l'administration des métaux lourds sur les rats femelles pour ne pas contaminer les mâles et ne pas affecter leur fertilité pour bien suivre les effets sur la fertilité, la pré-natalité et la mortalité chez les rats femelles.

Après les 10 jours de l'accouplement, les rats femelles rentrent dans une période de gestation pendant 3 semaines, durant cette période les rats mâles sont isolés et éloignés, les rats femelles des lots A et B sont traitées encore par les métaux lourds pendant les 3 semaines de la gestation (Figure 4.6).

Après la 3<sup>ème</sup> semaine de la gestation, c'est la mise bas des rats femelles, ensuite les 18 rats sont sacrifiées (Figure 4.6).

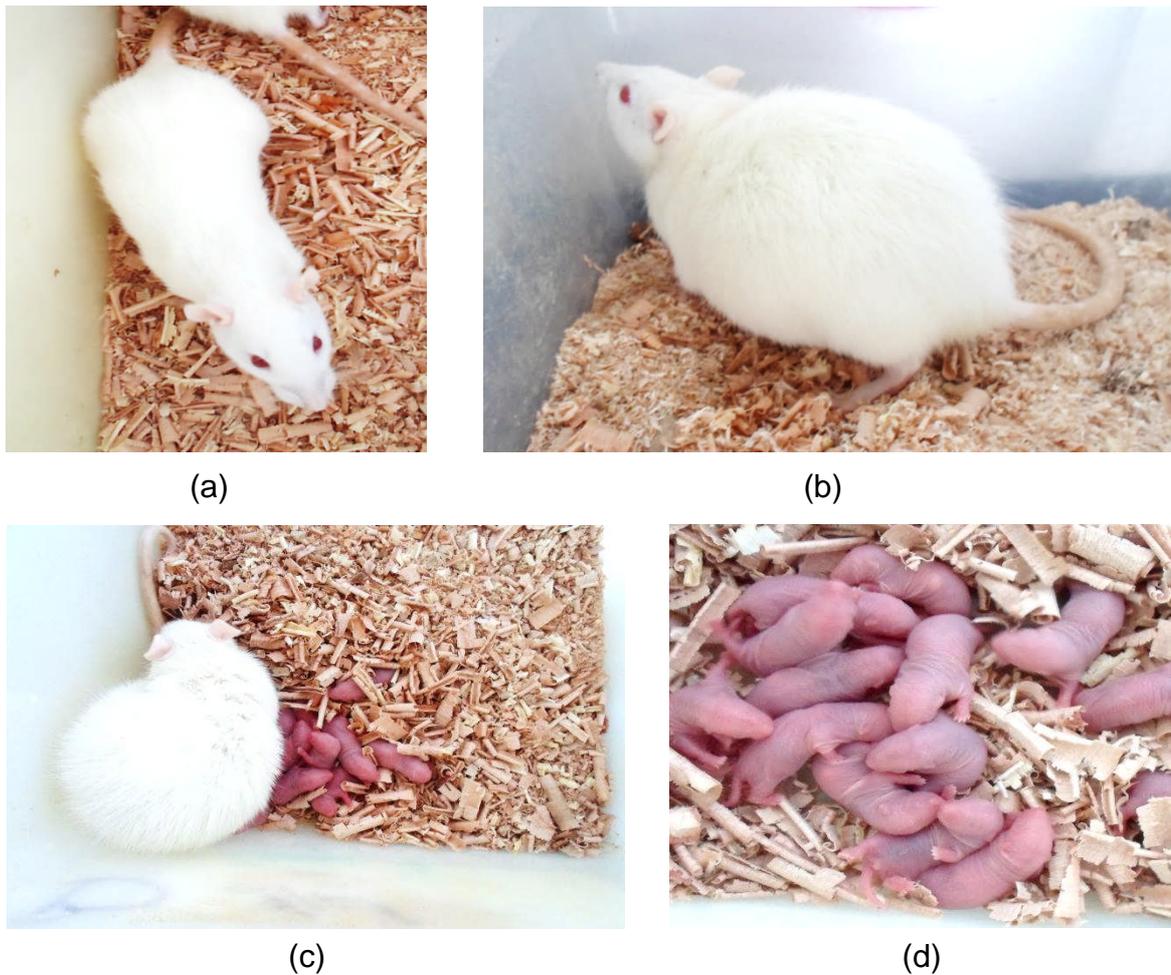


Figure 4.6 : Les différents états des femelles au cour de l'expérimentation (photo originale).

(a : Femelle non gestante, b : Femelle gestante, c : Femelle après la mise bas, d : Les petits rats après la mise bas).

### 2.3.3. Sacrifice des rats, prélèvement du sang et d'organes

Après les 7 semaines d'administration des doses de métaux lourds, les 3 lots de rats sont sacrifiées par décapitation, et cette dernière a eu lieu la matinée de 9 h à 11h afin d'éviter les variations hormonales pendant la journée.

Le sang artério-veineux est recueilli dans des tubes héparinés contenant une substance anticoagulante héparinate de lithium pour les différents dosages biochimiques et des tubes EDTA contenant 10 % de l'acide éthylènediamine tétra-acétique pour les dosages hématologiques, les tubes sont conservés dans une glacière jusqu'au laboratoire. Le sérum est obtenu après une centrifugation à 5000 tours pendant 3 minutes dans la centrifugeuse.

Après la dissection (Figure 4.7), les organes vitaux (poumons, foie et reins) sont aussi rapidement prélevés, dégraissés, pesés et placés dans un liquide fixateur le formol a 10 % afin de les garder intacts et protéger de l'autolyse et des attaques bactériennes, pour chercher ultérieurement les altérations structurales sur les tissus des organes (Figure 4.8).

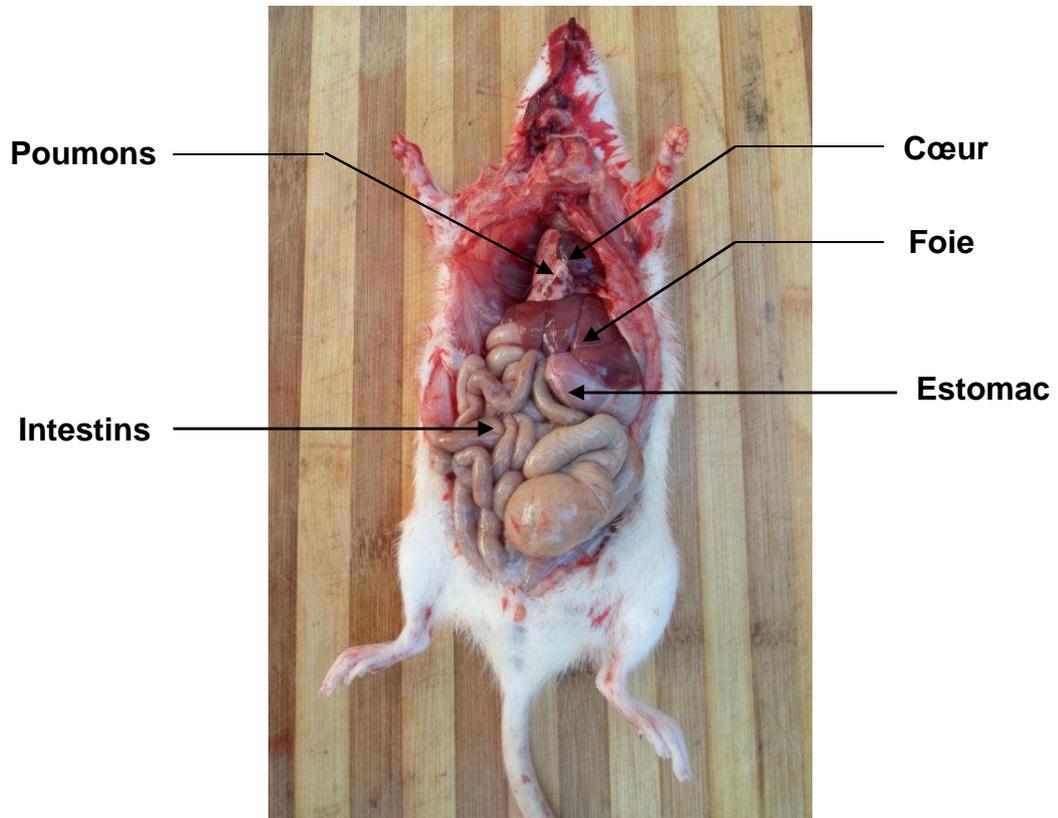


Figure 4.7 : Dissection de rat après décapitation (photo originale).

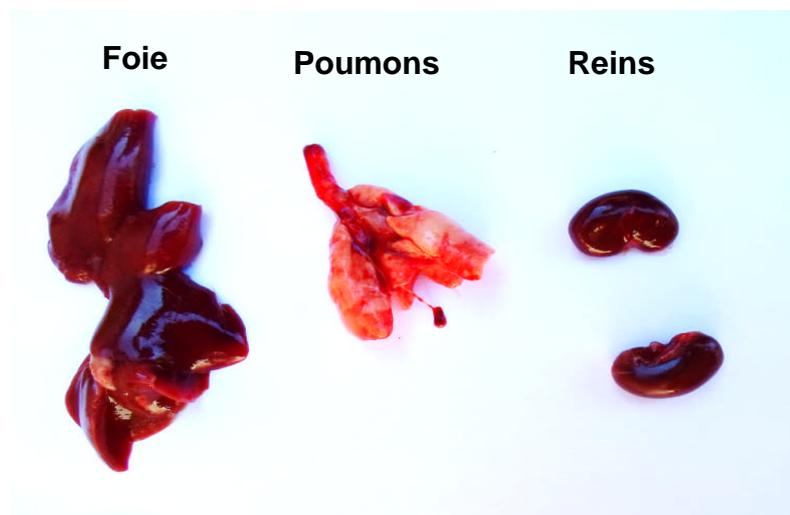


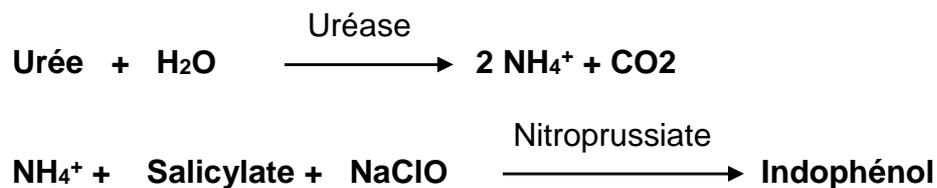
Figure 4.8 : Prélèvement des organes (foie, poumons et reins) (photo originale).

## 2.4. Analyses biochimiques du sang

### 2.4.1. Dosage de l'urée

#### ➤ Principe

Le dosage de l'urée est réalisé par une méthode colorimétrique enzymatique. L'urée présente dans l'échantillon réagit avec le réactif de travail en formant un composé de couleur verte (le Dicarboxyindophénol) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en urée [80]. La détermination enzymatique de l'urée suit les réactions suivantes [81] :



#### ➤ Mode opératoire

- Préparation du réactif de travail : mélanger les réactifs A1 et A2 (Appendice C). Le mélange reste stable pendant 2 mois entre 2 et 8°C.
  - Laisser tempérer les réactifs pendant quelques minutes à température ambiante.
- Pipeter dans des tubes à essai :
- Le blanc qui contient 1 mL du réactif A.
  - Le standard est un mélange de 10 µL de l'étalon d'urée et 1 mL du réactif A.
  - L'échantillon est un mélange de 10 µL du sérum et 1 mL du réactif A.
- Bien agiter et incuber les tubes pendant 10 min à température ambiante (16-25°C).
  - Pipeter dans chacun des tubes précédents 1 mL du réactif B (Appendice C)
  - Agiter et incuber pendant 10 min à température ambiante (16-25°C).

#### ➤ Lecture

La lecture est réalisée après avoir régler le spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 600 nm, sachant que l'épaisseur de la cuve est de 1 cm. Lire l'absorbance de la solution standard et de l'échantillon face au blanc.

### 2.4.2. Dosage de la créatinine

#### ➤ Principe

Le dosage de la créatinine est réalisé par une méthode colorimétrique cinétique. La créatinine forme un complexe rouge-orange en présence de l'acide picrique au milieu alcalin. La vitesse de la formation de ce complexe est proportionnelle à la quantité de la créatinine présente dans l'échantillon [82].

#### ➤ Mode opératoire

- Préparation du réactif de travail : mélanger à proportions égales, les réactifs 1 et 2. Ce mélange reste stable pendant 10 jours à 15-25°C.
- Pipeter dans des tubes à essai :
  - Le blanc qui contient 1 mL du réactif de travail.
  - Le standard qui est un mélange de 100 µL de l'étalon de la créatinine et 1 mL du réactif de travail.
  - L'échantillon qui contient 100 µL du sérum et 1 mL du réactif de travail.

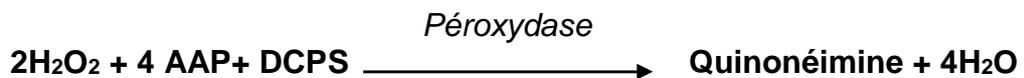
#### ➤ Lecture

La lecture est réalisée par un spectrophotomètre avec une cuve de 1 cm d'épaisseur, une longueur d'onde de 505 nm et une température de 37°C. Faire une première lecture après 30 secondes et une deuxième lecture après 90 secondes après l'addition du réactif de travail.

### 2.4.3. Dosage de l'acide urique

#### ➤ Principe

Le dosage de l'acide urique est réalisé par une méthode colorimétrique enzymatique. L'acide urique présent dans l'échantillon réagit avec le réactif de travail en formant un composé de couleur rouge (Quinonéimine) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en acide urique [83]. La détermination enzymatique de l'acide urique suit les réactions suivantes [84] :



4 AAP : Amino-4-Antipyrine.

DCPS: 2-4 dichlorophénol sulfonate.

➤ Mode opératoire

- Préparation du réactif de travail : mélanger le réactif 1 (tampon) et le réactif 2 (enzymes) (Appendice C). Bien agiter pour dissoudre les composants. Ce mélange reste stable pendant 1 mois à 2-8°C.
- Pipeter dans des tubes à essai :
  - Le blanc qui contient 1 mL du réactif de travail.
  - Le standard qui est un mélange de 1 mL du réactif de travail et 25 µL de l'étalon d'acide urique.
  - L'échantillon qui contient 1 mL du réactif de travail et 25 µL du sérum.
- Mélanger et incuber pendant 10 min à température ambiante (15-25°C).

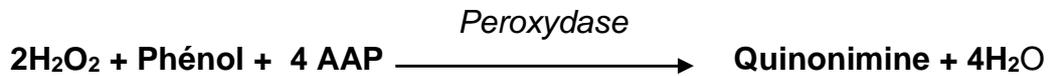
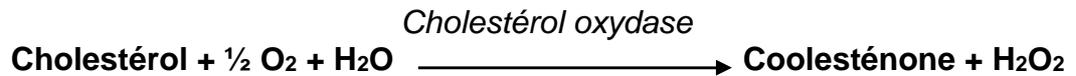
➤ Lecture

La lecture est réalisée après avoir réglé spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 520 nm, sachant que l'épaisseur de la cuve est de 1 cm. Lire l'absorbance de la solution standard et de l'échantillon face au blanc. La couleur reste stable pendant au moins 30 min.

2.4.4. Dosage du cholestérol total

➤ Principe

Le cholestérol libre ainsi que le cholestérol estérifié présents dans l'échantillon donnent, selon les réactions couplées décrites ci-dessous un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie [85].



➤ Mode opératoire

- Le réactif est tempéré pendant quelques minutes à température ambiante.
- Pipeter dans des tubes à essai :
  - Le blanc contient 1 mL du réactif de travail.
  - Le standard est un mélange de 10 µL de l'étalon du cholestérol et 1 mL du réactif de travail.
  - L'échantillon est un mélange de 10 µL du sérum et 1 mL du réactif de travail.
- Agiter et placer les tubes à température ambiante pendant 10 min.

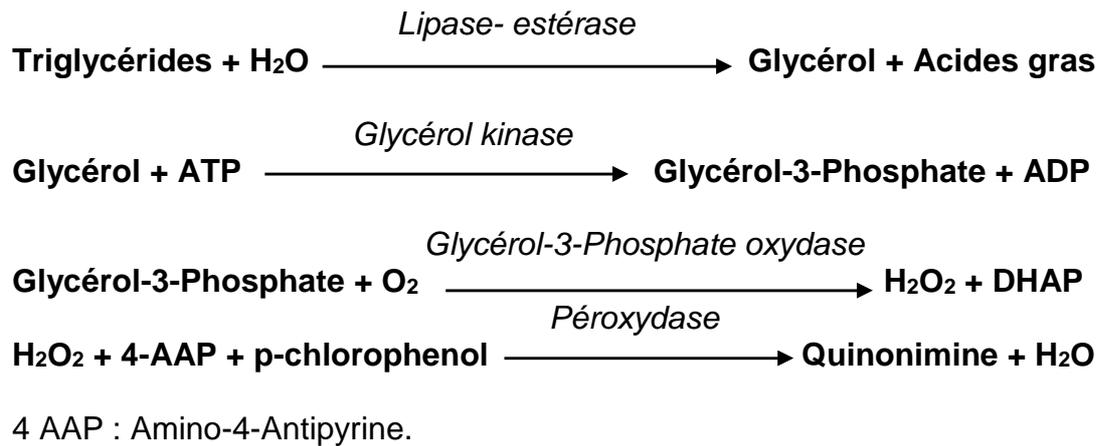
➤ Lecture

La lecture est réalisée par un spectrophotomètre avec une cuve de 1 cm d'épaisseur, une longueur d'onde de 500 nm et une température de 37°C. La coloration obtenue est stable au moins 2 heures.

#### 2.4.5. Dosage des triglycérides

➤ Principe

Les triglycérides sont hydrolysés enzymatiquement en glycérol et acides gras. Ce glycérol entre en réaction avec les différentes enzymes présentes dans le réactif de travail, entraînant la formation d'un dérivé coloré rouge. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de triglycérides de l'échantillon [86]. La détermination enzymatique des triglycérides suit les réactions suivantes [86] :



➤ Mode op\u00e9ratoire

- Pr\u00e9paration du r\u00e9actif de travail : m\u00e9langer les r\u00e9actifs 1 (tampon) et r\u00e9actif 2 (enzymes) (Appendice C). Cette pr\u00e9paration reste stable pendant 6 semaines entre 2°C et 8°C.
- Pipeter dans des tubes \u00e0 essai :
  - Le blanc qui contient 1 mL de solution de travail.
  - Le standard qui est un m\u00e9lange de 10 \u00b5L de l'\u00e9talon de triglyc\u00e9ride et 1 mL du r\u00e9actif de travail.
  - L'\u00e9chantillon qui contient 10 \u00b5L du s\u00e9rum et 1 mL de la solution de travail.
- Apr\u00e8s agitation, les 3 tubes sont incub\u00e9s \u00e0 37°C pendant 5 minutes.

➤ Lecture

La lecture est r\u00e9alis\u00e9e par un spectrophotom\u00e8tre avec une cuve de 1 cm d'\u00e9paisseur et une longueur d'onde de 505 nm.

## 2.5. Analyses h\u00e9matologiques du sang

### 2.5.1. D\u00e9termination de la formule de num\u00e9ration sanguine FNS

➤ Principe

Le dosage h\u00e9matologique est r\u00e9alis\u00e9 \u00e0 partir du sang entier (sans centrifugation) directement \u00e0 l'arriv\u00e9e des \u00e9chantillons au laboratoire. La d\u00e9termination quantitative des \u00e9l\u00e9ments figur\u00e9s du sang est r\u00e9alis\u00e9e par la cyom\u00e9trie en flux utilis\u00e9 sur un automate d'h\u00e9matologie. La fraction du faisceau lumineux que d\u00e9vient ces \u00e9l\u00e9ments permet de les quantifier [87].

➤ Mode opératoire

Mettre l'échantillon sanguin contenu dans un tube EDTA au niveau de l'aiguille d'absorption de façon qu'elle y soit plongée. L'opération d'absorption peut prendre quelques secondes.

➤ Lecture

Le résultat est donné directement imprimé par l'automate précisant la quantification de chaque paramètre : Globules blancs, Lymphocytes, Monocytes, Granulocytes, Globules rouges, Hémoglobine, Hématocrite, Volume Globulaire Moyen (VGM), Concentration moyenne en hémoglobine (TCMH), Concentration Corpusculaire Moyenne en Hématies (CCMH) et Plaquettes sanguines.

## 2.6. Etude histopathologique

### 2.6.1. Examen macroscopique des organes de rates

Il s'agit d'un constat visuel de l'apparence des organes (couleur, aspect), ainsi l'enregistrement de poids de chaque organe.

### 2.6.2. Examen microscopique des organes de rats

Il s'agit d'une observation microscopique des coupes histologiques au niveau des organes (foie, poumons et reins) réalisées sur des lames selon les étapes suivants :

#### 2.6.2.1. Fixation et rinçage

Cette étape a pour but d'immobiliser les structures en respectant dans la mesure du possible leur morphologie, de les conserver et de permettre la confection de préparation permanente. La fixation des organes est réalisée dans le formol à 10 % pendant 48 heures. Pour une meilleure fixation on provoque des lésions dans les organes et les reins sont coupés en deux, après 6 heures au minimum on prépare des tranches (pièces) à partir de chaque organe et les mise dans des cassettes spéciales en plastique et les conservées toujours dans le formol à 10 %, après 48 heures les pièces sont lavées à l'eau courante renouvelée plusieurs fois avant la déshydratation [88].

#### 2.6.2.2. Déshydratation

Les cassettes sont imprégnées dans six bains d'alcool éthylique à concentration croissante pour réaliser une déshydratation en douceur et non brutale qui risque de rétracter les cellules :

- Alcool 70° (deux bains de 1 heure chaque un).
- Alcool 90° (deux bains de 1 heure chaque un).
- Alcool 100° (deux bains de 1 heure chaque un).

#### 2.6.2.3. L'éclaircissement

L'alcool utilisé pour la déshydratation n'est pas miscible à la paraffine, pour cela il faut enlever l'alcool du tissu, ceci est effectué par deux bains de xylène pendant 5 minutes chacun [88].

#### 2.6.2.4. Imprégnation

Dans une étuve réglée à 58°C, les cassettes sont imprégnées dans un bain de la paraffine pure liquide à 58°pendant 12 heures.

#### 2.6.2.5. Inclusion et mise en bloc

L'inclusion consiste à faire pénétrer la paraffine dans les tissus qui va donner la résistance mécanique nécessaire à la réalisation des coupes au microtome, l'inclusion est réalisée selon les étapes suivantes :

- Ecoulement de la paraffine dans des moules métalliques.
- Inclusion et orientation des pièces dans la paraffine ( Figure 4.9) .
- Placement des cassettes, sur lesquelles est inscrit l'état de l'organe de l'animal et son sexe.
- Refroidissement des blocs de paraffine sur une plaque métallique réfrigérée environ 7 minutes [88].

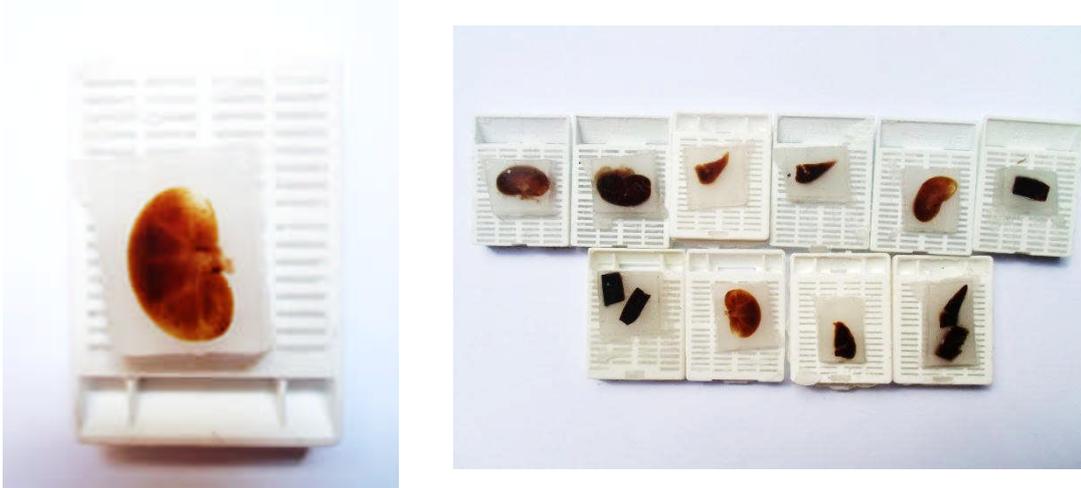


Figure 4.9 : Inclusion et mise en bloc des organes dans la paraffine (photo originale).

#### 2.6.2.6. Confection des coupes

Les blocs obtenus sont coupés au microtome de type LEICA RM 2125 RT. Avec une épaisseur de 5  $\mu\text{m}$ .

#### 2.6.2.7. Collage des rubans des coupes et leur séchage

Les rubans des coupes sont étalés dans un bain d'eau thermostatée (37°C) puis récupérés et collés sur des lames gélatinées et ensuite séchées dans l'étuve à 37°C pendant 12 heures.

#### 2.6.2.8. Déparaffinage et réhydratation

Le déparaffinage sert à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants puissent le pénétrer. Les coupes sont passées dans deux bains de xylène pendant 2 minutes chacun. La réhydratation a pour but de retirer le xylène du tissu et le remplacer par l'eau. Les pièces sont passées dans quatre bains d'éthanol en concentrations décroissantes : 100° ; 90° ; 70° pendant une durée d'une minute chacun. Elles sont enfin lavées à l'eau courante [88].

#### 2.6.2.9. Coloration

On procède à la coloration adoptée en anatomie pathologique, est celle de l'hémalum-éosine (HE) effectuée grâce à l'hémalum qui colore en bleu-violet les noyaux et à l'éosine qui colore le cytoplasme en rose, les hématies en rouge claire à

jaune et le collagène en jaune. La coloration hémalum-éosine est réalisée selon les étapes suivantes :

- Coloration des lames par une solution d'hémalum pendant 45 secondes.
- Rinçage à l'eau courante pour enlever l'excédent du colorant.
- Passage des lames par une solution de carbonate de lithium pendant 30 secondes.
- Rinçage à l'eau courante pour enlever le surplus de carbonate de lithium.
- Coloration des lames par d'éosine pendant 4 minutes.
- Rinçage par l'eau courante.
- Déshydratation : imprégner les lames dans des bains d'alcool éthylique aux concentrations croissantes pendant une durée de 30 secondes chacun.
- L'éclaircissement : on plonge les lames dans un bain de xylène pendant une durée de 5 minutes [88].

#### 2.6.2.10. Montage et observation microscopique

Le montage est la dernière étape de la préparation des lames pour la lecture en microscopie. Il s'agit d'un collage de la lamelle à la lame d'une manière rapide et durable, en utilisant un milieu de montage permanent. Le but est l'obtention d'un degré de transparence et d'indice de réfraction élevé mais aussi pour protéger mécaniquement l'étalement qui ne supporte pas le dessèchement. Le milieu de montage idéal est l'Eukitt [88].

Les lames sont séchées sur papier absorbant, nettoyées au xylène, la lecture se fait à l'aide d'un microscope photonique doté d'un appareil à photo. On prend plusieurs photos de chaque observation réalisée sous différents grossissements ( $G \times 10$  et  $G \times 40$ ).



Figure 4.10 : Coupes histologiques colorées et fixées sur des lames (photo originale).

### 2.7. Etude statistique

L'étude statistique a été réalisée à l'aide d'un logiciel de statistique Systat 7. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  Ecartype. Une analyse de variance puis un test t de Student sont effectués pour la comparer les résultats des rats témoins et les résultats des rats traités. Les différences sont jugées significatives quand  $p < 0,05$ . Le poids relatif de l'organe (g %) est déterminé comme suit :

$$\frac{\text{Poids absolu de l'organe (g)}}{\text{Poids absolu (g)}} \times 100$$

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Avant de commencer notre expérimentation animale, nous avons réalisé des analyses physico-chimiques sur l'aliment et l'eau destinés à l'alimentation des rats. Les résultats obtenus sont représentés ci-dessous :

### 1. Résultats des analyses physico-chimiques

#### 1.1. Résultats des analyses physico-chimiques de l'eau

Les résultats des analyses physicochimiques de l'eau de robinet destinée aux rats sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5.1 : Résultats des analyses physicochimiques de l'eau de robinet destinée aux rats.

Paramètres	Résultats	Norme *
Conductivité	999 $\mu$ S/cm	2800 $\mu$ S/cm
pH	8	6.5 - 8.5
Bicarbonate HCO <sub>3</sub>	244 mg/L	–
Calcium (Ca)	182,57 mg/L	75 - 200 mg/L
Magnésium (Mg)	101,76 mg/L	150 mg/L
Sodium (Na)	79 mg/L	200 mg/L
Potassium (K)	5,7 mg/L	20 mg/L
Chlorure (Cl)	52 mg/L	200 - 500 mg/L
Résidu sec	72,1 mg/L	1500 - 2000 mg/L

\* Norme Algérienne selon l'arrêté ministériel du 26 Juillet 2000 relatif aux critères de qualité de l'eau potable [89].

Les analyses physico-chimiques de l'eau de robinet destinée aux rats et pour la préparation des solutions des métaux lourds a pour but de vérifier sa composition et sa qualité physico-chimique.

D'après les résultats du tableau 5.1 et selon norme présentée dans l'arrêté ministériel du 26 Juillet 2000 relatif aux critères de qualité de l'eau potable, l'eau de robinet de la commune Ouled Yaich -Blida est de bonne qualité physico-chimique, tous les paramètres physicochimiques recherchés sont dans l'intervalle des valeurs admissibles.

Notons que le taux de chlore ne doit pas être trop élevé car la vitamine C est dégradée par celui-ci [90]. Or le taux de chlorure dans notre eau est de 52 mg/L, ce qui est faible par rapport à la valeur maximale tolérée et qui est de 500 mg/L : ainsi la vitamine C dans l'alimentation des rats est bien préservée.

Il est à signaler que notre eau est riche en calcium et magnésium qui sont des éléments essentiels dans l'alimentation des rats. L'apport nutritionnel en ces deux éléments est intéressant surtout en cas de déficit en ces besoins.

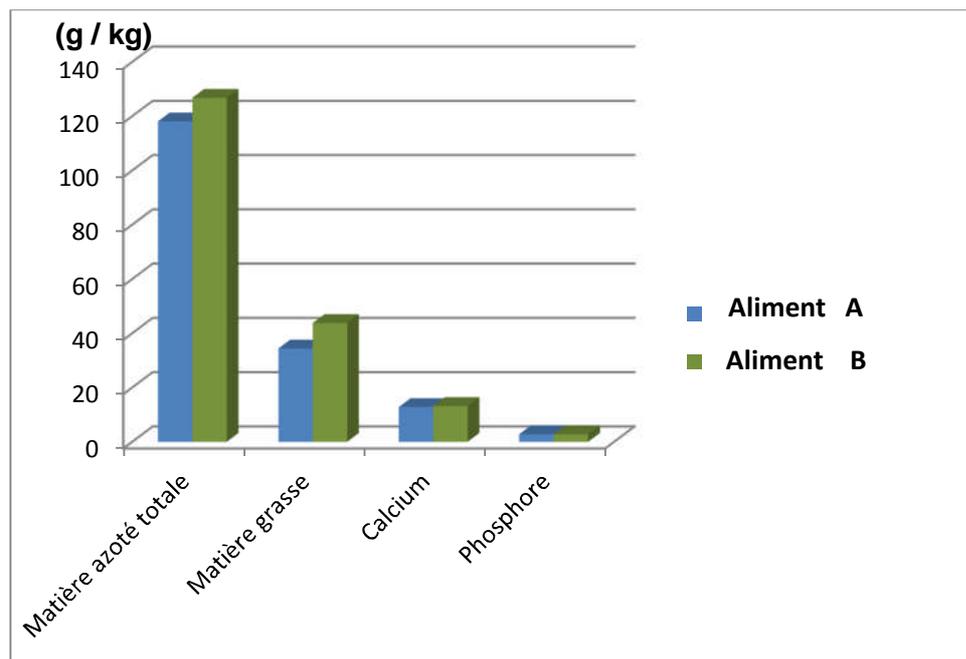
Les rats boivent 140 millilitres d'eau par kilogramme de poids corporel par jour. Ils boivent en moyenne 2 ml d'eau pour chaque gramme de nourriture sèche [91]. Pour cela la qualité de l'eau est très importante pour la croissance normale et la santé des rats ce qui pourrait influencer directement sur la fiabilité des résultats obtenus au cours de l'expérimentation animale.

## 1.2. Résultats des analyses physico-chimiques de l'aliment des rats

Les analyses physico-chimiques font ressortir la composition en nutriments essentiels suivante.

Tableau 5.2 : Composition en nutriments essentiels de l'aliment destiné aux rats (avec et enrichi en spiruline).

Nutriments (g / kg d'aliment)	Aliment sans spiruline <b>(Aliment A)</b>	Aliment enrichi en spiruline <b>(Aliment B)</b>
Matière azotée totale	118,10	126,80
Matière grasse	34,40	43,80
Calcium	12,80	13,20
Phosphore	2,80	2,80



**Aliment A** : Sans spiruline.

**Aliment B** : Enrichi en spiruline.

Figure 5.1 : Composition nutritionnelle de l'aliment (sans et enrichi en spiruline) destiné aux rats.

Selon les résultats du tableau 5.2 et la figure 5.1 nous remarquons que :

La teneur en matière azotée totale qui est représentée essentiellement par les protéines est plus élevée dans l'aliment enrichi en spiruline (aliment B) par rapport à l'aliment sans spiruline (aliment A) malgré que l'enrichissement est de l'ordre de 1% c'est-à-dire 1 g de spiruline pour 99 g de l'aliment. Selon Clément (1975) la teneur en protéines chez *Spirulina platensis* est de 60 à 70 % de sa matière sèche ce qui explique nos résultats.

Tableau 5.3 : Recommandations alimentaires chez le rat aux différents stades physiologiques [92, 93 et 94].

Nutriments (g / kg) d'aliment	Entretien	Croissance	Gestation	Lactation
Matière azotée totale	> 50 à 70	150	150	150
Matières grasses	50	50	50	50
Calcium	5	5	6,3	6,3
Phosphore	3	3	3,7	3,7

En comparant nos résultats avec les recommandations alimentaires chez le rat (tableau 5.3), les besoins sont couverts pour le stade d'entretien pour les deux types d'aliment.

Une carence de la matière azotée dans les deux aliments (A et B) pour les stades physiologiques : croissance et gestation. Elle est de 31,5 g/kg pour l'aliment A et de 23,2 g/kg pour l'aliment B. Cependant cette carence n'est pas très significative elle peut être récupérée automatiquement à travers la quantité de l'aliment ingérée par les rats chaque jour. C'est d'ailleurs l'avantage de l'alimentation à volonté où le rat mange jusqu'à la couverture de tous ses besoins nutritionnels.

Aussi, les rats sont des animaux coprophages c'est-à-dire qu'ils ingèrent une partie de leurs fèces. Ce comportement leur permet de récupérer des vitamines du groupe B, de la vitamine K et d'autres nutriments synthétisés par la flore digestive

pendant le transit et ainsi que certains acides aminés et certaines protéines, cela leur permet de couvrir qu'une partie de leurs besoins nutritionnels [94 et 95]. On considère que 50-65 % des matières fécales de rats nourris avec des régimes alimentaires adéquats qui peuvent être réingérées par coprophagie [96].

Le taux de la matière grasse est plus élevé dans l'aliment B par rapport à celui de l'aliment A.

Les lipides représentent généralement 6 à 8 % du poids sec de la Spiruline et ce pourcentage peut atteindre 11 % [97], cette teneur explique la richesse de l'aliment avec spiruline.

Mais en comparant nos résultats avec les recommandations alimentaires chez le rat présentées dans le tableau 5.3, il en ressort une carence pour les deux types d'aliments ; une carence de 15,6 g/kg pour l'aliment A et de 6,5 g/kg pour l'aliment B.

Pour le calcium les résultats de l'analyse montrent que l'aliment B est plus riche en calcium que l'aliment A. Selon Falquet et Hurni (2006) la spiruline est riche en calcium avec une teneur de 1,3-1,4 g/kg.

En terme de concentration, les deux types d'aliment couvrent les besoins des rats en matière de calcium.

Concernant le phosphore, les résultats d'analyse font ressortir une même teneur pour les deux types d'aliments. En effet la spiruline utilisée pour l'enrichissement est très pauvre en phosphore.

D'une manière générale, les résultats des analyses physicochimiques de l'aliment des rats montrent que l'aliment enrichi en spiruline est plus riche en protéines, matière grasse et calcium.

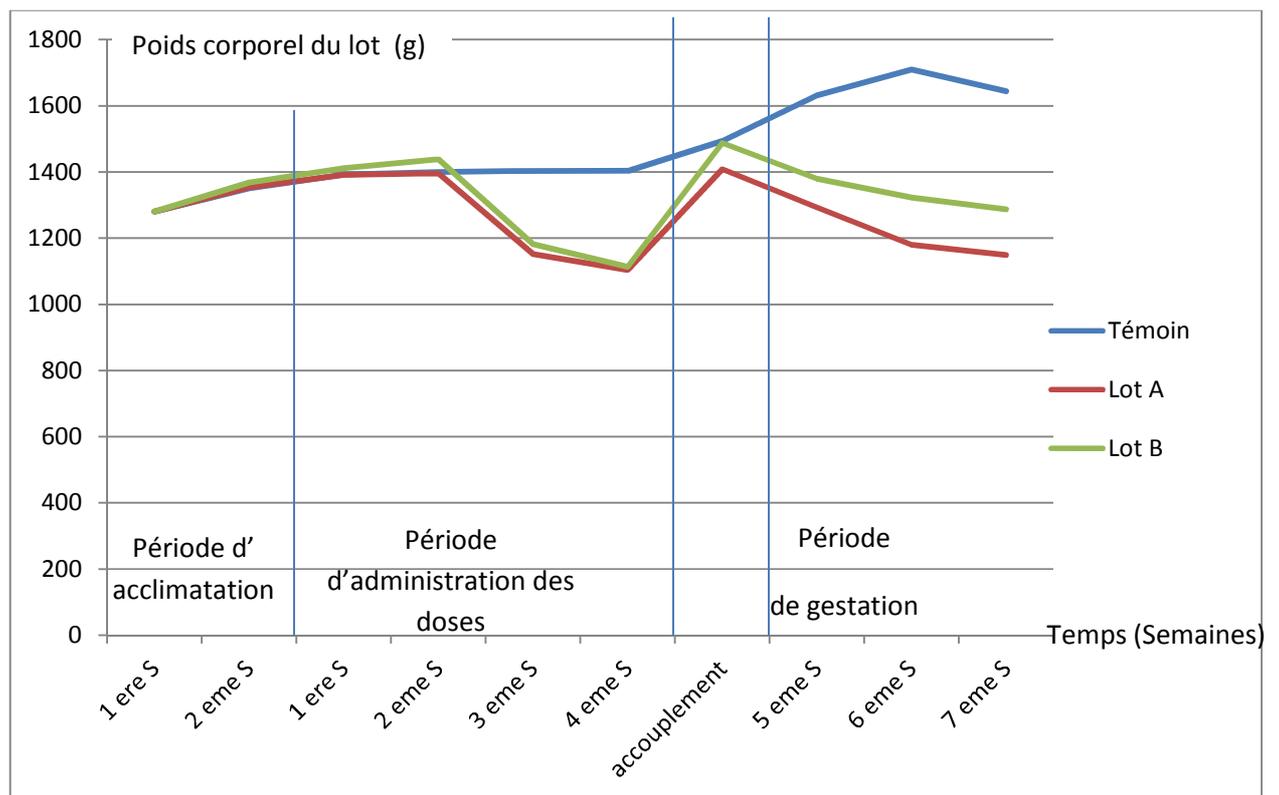
## 2. Résultats de l'expérimentation animale

Nous avons procédé à une expérimentation animale sur un groupe de rats femelles de souche Wistar pour évaluer la toxicité des métaux lourds et apprécier l'effet attendu de la spiruline, nous avons réalisé le suivi de plusieurs paramètres.

### 2.1. Résultats de suivi du poids, quantité d'aliment et comportement des rats

Pendant toute la période de l'expérimentation animale, l'évaluation pondérale, la quantité de l'aliment ingérée et le comportement de chaque rat ont été suivis chaque semaine et les enregistrements des résultats sont présentés dans les tableaux suivants :

Les résultats de l'évaluation pondérale des 3 lots (sans spiruline, avec spiruline et témoin) pendant toute la durée de l'expérimentation sont résumés d'une façon générale et récapitulative sous forme des courbes dans la figure suivante :



**Lot A** : Nourri avec l'aliment sans spiruline. **Lot B** : Nourri avec l'aliment enrichi en spiruline.

Figure 5.2 : Evaluation pondérale des 3 lots pendant la durée de l'expérimentation.

Pendant les deux premières semaines d'acclimatation, ainsi que les deux premières semaines d'administration des doses de métaux lourds, il n'y a pas une grande différence de poids corporel pour les 3 lots.

A partir de la 3<sup>ème</sup> semaine d'administration des métaux lourds, une grande chute de poids est observées pour les lots A et B même si le poids du lot B reste toujours un peu supérieur à celui du lot A. Cette chute se termine juste au début des 10 jours d'accouplement.

Le poids du lot témoin reste un peu stable jusqu'au le début des 10 jours d'accouplement, et pendant les 10 jours d'accouplement nous remarquons une grande augmentation du poids des lots A et B et le poids du lot B reste toujours supérieur à celui du lot A et devient presque comme le lot témoin.

Pendant les 3 semaines de gestation et administration des doses de métaux lourds, une augmentation remarquable dans le poids du lot témoin pendant la gestation et à la fin de la 3<sup>ème</sup> semaine de gestation, une diminution est observée après la mise bas, alors que les lots A et B ont subi encore une grande chute du poids corporel.

Pour ce qui est des résultats d'évaluation de la quantité d'aliment ingérée par les rats des 3 lots (lot A, lot B et lot témoin) pendant la durée de l'expérimentation, nous les avons résumés dans la figure suivante :

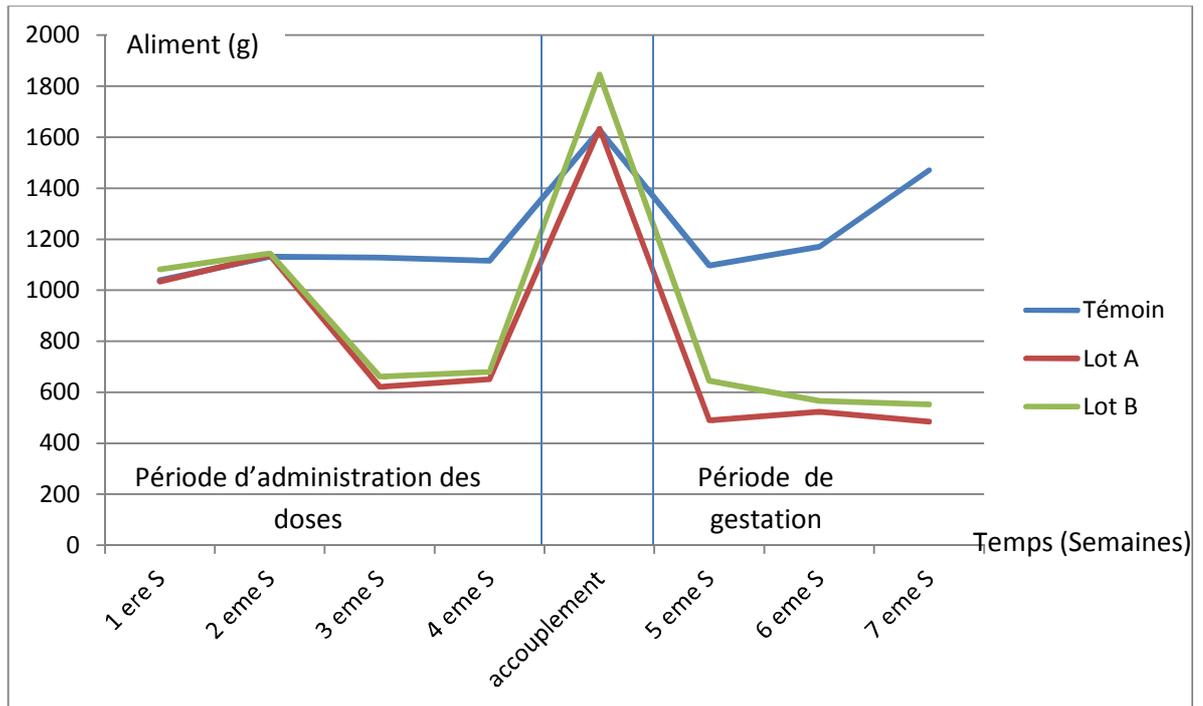


Figure 5.3 : Evaluation de la quantité d'aliment ingérée par les rats des 3 lots pendant la durée de l'expérimentation.

Pendant les deux premières semaines d'administration des doses de métaux lourds, il n'y a pas une grande différence de consommation entre les 3 lots.

A partir de la 3<sup>ème</sup> semaine d'administration des métaux lourds, une grande chute de la quantité d'aliment ingérée est remarquée pour les lots A et B. La quantité d'aliment ingérée par le lot témoin reste un peu stable jusqu'au début des 10 jours d'accouplement, et pendant les 10 jours d'accouplement nous remarquons une grande augmentation de la quantité d'aliment ingérée pour les lots A et B où le lot A devient presque comme le lot témoin et le lot B dépasse beaucoup le témoin.

La signification des différences du poids corporel et de la quantité d'aliment ingérée entre les 3 lots sous l'effet des traitements est démontrée par l'étude statistique.

A ce niveau, pour déterminer la signification des différences entre les trois lots au cours des dix semaines de l'expérimentation, nous avons divisé la période de l'expérimentation en 4 étapes :

- 1- L'acclimatation : 2 semaines.
- 2- L'administration des métaux lourds : 4 semaines.
- 3- L'accouplement : 10 jours.

4- La gestation et administration des métaux lourds: 3 semaines.

### 2.1.1. La période d'acclimatation

#### 2.1.1.1. Résultats de la première semaine d'acclimatation (sans spiruline)

Les résultats de suivi du poids corporel des rats pendant la première semaine d'acclimatation sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5.4 : Evaluation pondérale des rats pendant la première semaine d'acclimatation.

Lot	N° de rat	Poids corporel (g)	Poids total de lot (g)
A	1	235	1280 g
	2	220	
	3	220	
	4	210	
	5	205	
	6	190	
Moyenne ± écartype		213,33 ± 15,38	
B	1	230	1280 g
	2	220	
	3	220	
	4	215	
	5	205	
	6	190	
Moyenne ± écartype		213,33 ± 14,02	
Témoin	1	225	1280 g
	2	225	
	3	220	
	4	215	
	5	200	
	6	195	
Moyenne ± écartype		213,33 ± 12,90	

Les rats d'expérimentation sont connus par être des animaux intelligents, généralement dociles et si on les manipule fréquemment et gentiment ils deviennent apprivoisés et faciles à dresser, ils démontrent une grande variété de caractéristiques comportementales représentant un intérêt dans la recherche [98].

Concernant le comportement des rats, dès leur arrivée à la station d'expérimentation animale de la faculté des sciences de la nature et de la vie et pendant la première semaine d'acclimatation, les rats des 3 lots n'ont pas montré

aucune anomalie de comportement, et ceci signifie qu'ils se sont bien adaptés à l'alimentation et aux conditions d'environnement.

Les résultats de l'étude statistique de suivi de poids corporel des rats pendant la première semaine d'acclimatation sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5.5 : Etude statistique des résultats du poids corporel des rats pendant la première semaine d'acclimatation et leurs significations.

	Témoïn / Lot A		Témoïn / Lot B		Lot A / Lot B	
Moyenne (g) ± écartype	213,33 ± 12,90	213,33 ± 15,38	213,33 ± 12,90	213,33 ± 14,02	213,33 ± 15,38	213,33 ± 14,02
Seuil de Significativité p < 0,05	0,5		0,5		0,5	

Le poids corporel est un critère très apparent qui donne une image claire sur la santé des rats, tout changement dans le poids corporel soit par prise ou perte du poids au delà de la normale indiquerait une anomalie physiologique [99].

Le raton à la naissance pèse à peu près 5 grammes, est aveugle mais très actif et atteint rapidement 35-50 grammes en trois semaines. Un mâle adulte pèse entre 300 et 500 grammes alors que la femelle pèse entre 200 et 400 grammes. Certains individus obèses (génétiquement ou suralimentés) peuvent atteindre plus de 1 kilogramme. Le rapport taille/poids varie beaucoup selon les lignées [100 et 101].

Pendant la première semaine d'acclimatation tous les rats sont alimentés par un régime sans spiruline et sans diviser en lots,

En effet pour les adapter aux conditions climatiques et au régime alimentaire, à la fin de cette semaine et selon les résultats du poids de chaque rat (tableau 5.4), les rats sont divisés en 3 lots de poids homogène, dont le poids moyen est de 213,33 g et le poids du lot est de 1280 g.

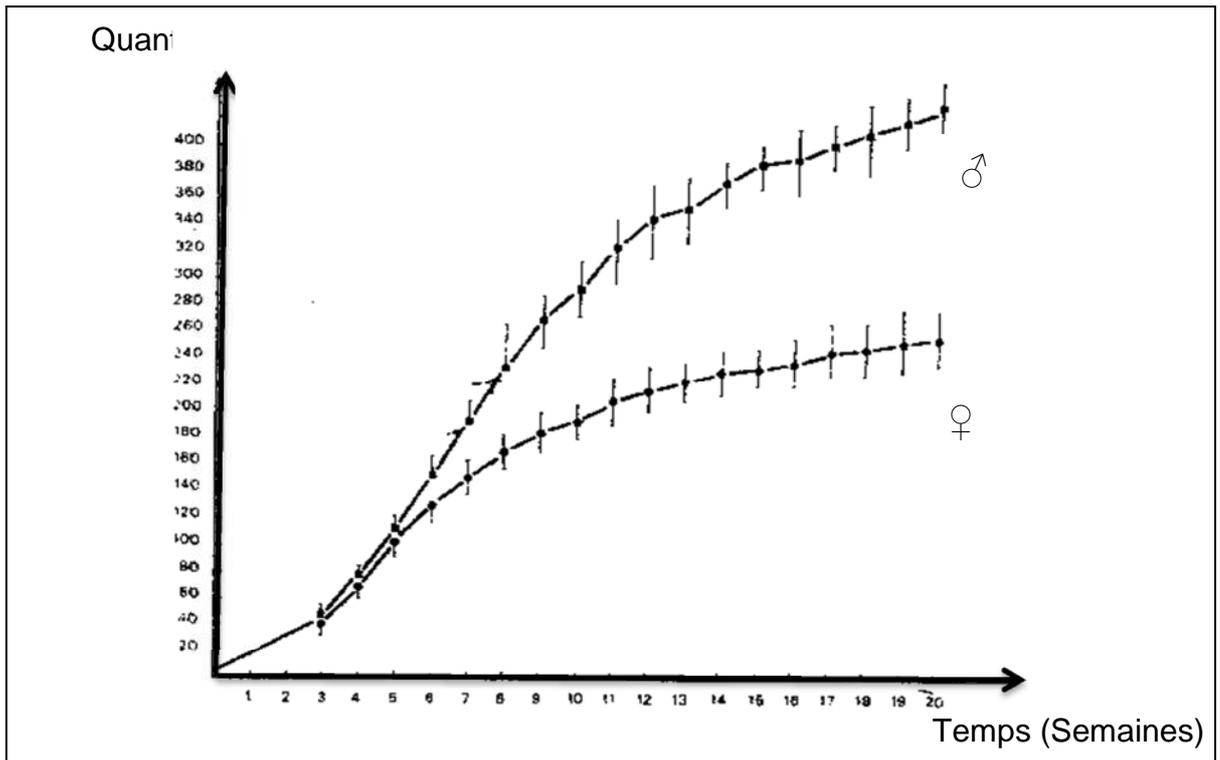


Figure 5.4 : La courbe d'évaluation pondérale du rat Wistar male et femelle [102].

On comparant le poids moyen de nos rats avec la courbe d'évaluation pondérale de la figure 5.4, nous remarquons que le poids de nos rats est dans les normes pour un âge de 13 semaines, Ainsi donc nos rats sont en bonne santé et bien portantes et que notre aliment a couvert les besoins nutritionnels de nos rats.

### 2.1.1.2. Résultats de la deuxième semaine d'acclimatation (avec spiruline)

Les résultats de suivi du poids corporel des rats pendant la deuxième semaine d'acclimatation sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5.6 : Evaluation pondérale des rats pendant la deuxième semaine d'acclimatation.

Lot	N° de rat	Poids corporel (g)	Poids totale de lot (g)
A	1	246	1354 g
	2	231	
	3	230	
	4	225	
	5	222	
	6	200	
Moyenne $\pm$ écartype		225,66 $\pm$ 15,05	
B	1	244	1368 g
	2	235	
	3	230	
	4	225	
	5	223	
	6	211	
Moyenne $\pm$ écartype		228,66 $\pm$ 11,24	
Témoin	1	236	1351 g
	2	234	
	3	231	
	4	224	
	5	214	
	6	212	
Moyenne $\pm$ écartype		225,16 $\pm$ 10,28	

Pendant la deuxième semaine d'acclimatation le lot témoin et le lot A sont alimentés par un régime alimentaire sans spiruline alors que le lot B est sous mis à un régime enrichi en spiruline. Ceci est fait pour que les rats du lot B puissent s'adapter au régime avec spiruline avant que nous entamions l'administration des doses de métaux lourds.

Après la deuxième semaine d'acclimatation, aucun changement de comportement n'a été remarqué sur les 3 lots de rats, il semblerait que les rats du lot B se sont bien adaptés au régime alimentaire enrichi en spiruline.

Les résultats de l'étude statistique du suivi du poids corporel des rats pendant la deuxième semaine d'acclimatation sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 5.7 : Etude statistique des résultats du poids corporel des rats pendant la deuxième semaine d'acclimatation et leurs significations.

	Témoin / Lot A		Témoin / Lot B		Lot A / Lot B	
Moyenne (g) ± Ecartype	225,16 ± 10,28	225,66 ± 15,05	225,16 ± 10,28	228,66 ± 11,24	225,66 ± 15,05	228,66 ± 11,24
Seuil de Significativité $p < 0,05$	0,473		0,329		0,383	

L'évaluation pondérale montre que la différence du poids est négligeable et non significative entre le lot témoin et le lot A.

Une augmentation un peu plus intéressante (1,31%) de poids corporel du lot B par rapport au lot témoin et au lot A est observée. Cette différence selon le test de signification n'est pas significative mais nous devons la mentionner. Elle pourrait être expliquée par la richesse de la spiruline en protéines, matière grasse, calcium et autres nutriments.

## 2.1.2. La période d'administration des métaux lourds

### 2.1.2.1. Résultats de la première semaine d'administration des métaux lourds

Les résultats de suivi du poids corporel et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la première semaine d'administration des métaux lourds sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 5.8 : Evaluation pondérale et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la première semaine d'administration des métaux lourds.

Lot	N°	Poids corporel (g)	Quantité d'aliment ingérée (g)
A	1	252	180
	2	240	192
	3	236	158
	4	230	160
	5	227	178
	6	206	166
	T	1391 g	1034 g
Moyenne ± écartype		231,83 ± 15,39	172,33 ± 13,23
B	1	247	214
	2	241	189
	3	234	170
	4	231	190
	5	232	168
	6	227	151
	T	1412 g	1082 g
Moyenne ± écartype		235,33 ± 7,33	180,00 ± 22,00
Témoin	1	240	539
	2	238	
	3	236	
	4	234	500
	5	222	
	6	222	
	T	1392 g	1039 g
Moyenne ± écartype		232,00 ± 8,00	173,16

T : Total

Pendant la première semaine d'administration des doses de métaux lourds, aucun changement de comportement n'a été remarqué chez les rats des 3 lots, cela est expliqué par les faibles doses des métaux lourds administrées (ceci a été opéré pour ne pas provoquer un choc chez les rats).

Les résultats de l'étude statistique du suivi du poids corporel et la quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la première semaine d'administration des doses de métaux lourds a donné les résultats suivants :

Tableau 5.9 : Etude statistique des résultats du poids corporel et la quantité d'aliment ingérée par les rats durant la première semaine d'administration des doses de métaux lourds et leurs significations.

Moyenne ± écartype	(1) Témoin / Lot A		(2) Témoin / Lot B		(3) Lot A / Lot B		Seuil de Significativité $p < 0,05$
Poids corporel (g)	232,00	231,83	232,00	235,33	231,83	235,33	(1) 0,4
	± 8,00	± 15,39	± 8,00	± 7,33	± 15,39	± 7,33	(2) 0,2
							(3) 0,3
Quantité d'aliment ingérée (g)		172,33		180,00	172,33	180,00	(1) 0,4
		± 13,23		± 22,00	± 13,23	± 22,00	(2) 0,4
	173,16		173,16				(3) 0,4

Concernant l'évaluation pondérale des 3 lots pendant la première semaine d'administration des doses de métaux lourds et d'après les données du tableau 5.9, une différence négligeable et non significative entre le lot témoin et le lot A est notée du fait des faibles dose de métaux lourds administrées, Une augmentation un peu plus considérable (1,48 %) du poids corporel ressort au niveau du lot B. Cette différence selon le test de signification n'est pas significative mais nous devons la quand même la noter. Elle est probablement due à la richesse nutritionnelle de la spiruline.

A partir de la première semaine d'administration des métaux lourds nous avons commencé le suivi de la quantité d'aliment ingérée pour chaque lot des rats.

La quantité de ration alimentaire quotidienne est ajustée en fonction de l'état physiologique des animaux (entretien, croissance, gestation ou lactation), de l'activité et le facteur de stress.

La quantité de l'aliment à une relation directe avec le poids de l'animal, dans le cas d'une étude toxicologique le suivi de la quantité d'aliment ingéré est important plus le suivi du développement pondéral [103].

Concernant la quantité d'aliment ingérée pour chaque lot de rats pendant la première semaine d'administration des métaux lourds et d'après les données du tableau 5.9, nous avons une différence négligeable et non significative entre les 3 lots : témoin, lot A et lot B, à cause des faibles doses de métaux lourds administrées.

Les rats adultes consomment quotidiennement 12-30 grammes d'aliments secs en cube, si le régime est complet, ils n'ont pas besoin de supplément alimentaire [91].

Dans notre expérimentation, les rats du lot témoin ont ingéré une quantité moyenne de 173,16 g d'aliment par semaine et c'est l'équivalent de 24,73 g par jour. Ces résultats sont en accord avec la littérature scientifique, cela indiquerait que notre étude s'est déroulée dans des bonnes conditions d'expérimentation.

### 2.1.2.2. Résultats de la deuxième semaine d'administration des métaux lourds

Les résultats de suivi du poids corporel et quantité d'aliment ingérée par les rats durant la deuxième semaine d'administration des métaux lourds sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5.10 : Evaluation pondérale et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la deuxième semaine d'administration des métaux lourds.

Lot	N°	Poids corporel (g)	Quantité d'aliment ingérée (g)
A	1	252	200
	2	239	200
	3	233	160
	4	233	163
	5	230	185
	6	209	229
	T	1396 g	1137 g
Moyenne ± écartype		232,66 ± 14,00	189,5 ± 25,97
B	1	250	232
	2	243	176
	3	244	216
	4	239	176
	5	234	180
	6	229	164
	T	1439 g	1144 g
Moyenne ± écartype		239,83 ± 7,52	190,66 ± 26,85
Témoin	1	242	567
	2	239	
	3	238	
	4	236	565
	5	223	
	6	222	
	T	1400 g	1132 g
Moyenne ± écartype		233,33 ± 8,16	188,66

Pendant la deuxième semaine d'administration des métaux lourds, et malgré l'augmentation des doses, aucun changement ou perturbation n'a été enregistré dans le comportement de rats des trois lots.

Les résultats de l'étude statistique de suivi du poids corporel et la quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la deuxième semaine d'administration des métaux lourds sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5.11 : Etude statistique des résultats du poids corporel et la quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la deuxième semaine d'administration des métaux lourds et leurs significations.

Moyenne ± Ecartype	(1) Témoin / Lot A		(2) Témoin / Lot B		(3) Lot A / Lot B		Seuil de Significativité p < 0,05
Poids corporel (g)	233,33	232,66	233,33	239,83	232,66	239,83	(1) 0,4
	± 8,16	± 14,00	± 8,16	± 7,52	± 14,00	± 7,52	(2) 0,09
							(3) 0,1
Quantité d'aliment ingérée (g)		189,5		190,66	189,5	190,66	(1) 0,4
		± 25,97		± 26,85	± 25,97	± 26,85	(2) 0,4
	188,66		188,66				(3) 0,4

concernant l'évaluation pondérale des 3 lots pendant la deuxième semaine d'administration des métaux lourds et d'après les données du tableau 5.11, une différence négligeable et non significative entre le lot témoin et le lot A, à cause des faibles doses de métaux lourds administrées, Une augmentation un peu considérable (2,98 %) de poids corporel du lot B par rapport à lot témoin et lot A, cette différence selon le test de signification n'est pas significative mais nous devons marquer ce point, cette différence est expliquée par la richesse nutritionnelle de la spiruline.

Concernant la quantité d'aliment ingérée par chaque lot des rats pendant la deuxième semaine d'administration des métaux lourds et d'après les données du tableau 5.11, une différence négligeable et non significative entre les 3 lots à cause des faibles doses de métaux lourds administrées.

### 2.1.2.3. Résultats de la troisième semaine d'administration des métaux lourds

Les résultats de suivi du poids corporel et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la troisième semaine d'administration des métaux lourds sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5.12 : Evaluation pondérale et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la troisième semaine d'administration des métaux lourds.

Lot	N°	Poids corporel (g)	Quantité d'aliment ingérée (g)
A	1	200	87
	2	199	116
	3	209	114
	4	204	100
	5	191	116
	6	149	88
	T	1152 g	621 g
Moyenne ± écartype		192,00 ± 21,89	103,50 ± 13,76
B	1	224	126
	2	183	126
	3	185	96
	4	198	99
	5	212	124
	6	180	90
	T	1182 g	661 g
Moyenne ± écartype		197,00 ± 17,79	110,16 ± 16,88
Témoin	1	242	576
	2	238	
	3	236	
	4	239	552
	5	225	
	6	224	
	T	1404 g	1128 g
Moyenne ± écartype		234,66 ± 7,61	188,00

Après la grande augmentation dans les doses des métaux lourds pendant la troisième semaine ( $\text{HgCl}_2$ :0,02 ;  $\text{CdCl}_2$ :50 ;  $\text{PbC}_4\text{H}_6\text{O}_4$ :100 mg/rat/jr), les métaux lourds ont eu un effet très apparent sur le comportement des rats des lots A et B qui sont apparus faibles moins dynamiques, s'agirait d'un témoignage et preuve de toxicité [104], par rapport au lot témoin qui ne présente aucun changement de comportement.

Tableau 5.13 : Etude statistique des résultats du poids corporel et la quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la troisième semaine d'administration des métaux lourds et leurs significations.

Moyenne ± écartype	(1) Témoin / Lot A		(2) Témoin / Lot B		(3) Lot A / Lot B		Seuil de Significativité p < 0,05
Poids corporel (g)	234,66	192,00	234,66	197,00	192,00	197,00	(1) 0,006***
	± 7,61	± 21,89	± 7,61	± 17,79	± 21,89	± 17,79	(2) 0,004***
							(3) 0,3
Quantité d'aliment ingérée (g)		103,50		110,16	103,50	110,16	(1) 0,0001***
	188,00	± 13,76	188,00	± 16,88	± 13,76	± 16,88	(2) 0,0001***
							(3) 0,2

\*\*\* : Très hautement significative.

Pour l'évaluation pondérale des 3 lots pendant la troisième semaine d'administration des métaux lourds et d'après les résultats du tableau 5.13, une grande différence hautement significative ressort entre le lot témoin et les lots A et B, du fait des doses élevées des métaux lourds administrées. Cependant la différence de poids corporel entre le lot B et le A est peu considérable (2,53 %).

Concernant la quantité d'aliment ingérée par chaque lot de rats pendant la troisième semaine d'administration des métaux lourds et d'après les données du tableau 5.13, nous avons les mêmes résultats que celui du poids corporel sauf que la différence entre le lot A et B ici est non significative et très négligeable.

#### 2.1.2.4. Résultats de la quatrième semaine d'administration des métaux lourds

Les résultats de suivi du poids corporel et quantité d'aliment ingérée les rats pendant la quatrième semaine d'administration des métaux lourds sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5.14 : Evaluation pondérale et quantité d'aliment les rats pendant la quatrième semaine d'administration des métaux lourds.

Lot	N°	Poids corporel (g)	Quantité d'aliment ingérée (g)
A	1	188	85
	2	192	134
	3	200	118
	4	186	94
	5	188	131
	6	150	89
	T	1104 g	651 g
Moyenne ± écartype		184,00 ± 17,38	105,50 ± 21,86
B	1	210	164
	2	186	136
	3	153	70
	4	189	150
	5	198	100
	6	177	99
	T	1113 g	680 g
Moyenne ± écartype		185,50 ± 19,48	119,83 ± 35,86
Témoin	1	241	563
	2	238	
	3	238	
	4	237	553
	5	225	
	6	224	
	T	1403 g	1116 g
Moyenne ± écartype		233,83 ± 7,35	186,00

Malgré que nous avons diminué les doses de métaux lourds pendant la quatrième semaine ( $\text{HgCl}_2$ : 0,10 ;  $\text{CdCl}_2$ : 32 ;  $\text{PbC}_4\text{H}_6\text{O}_4$ : 60 mg/rat/jr), leurs effets toxiques sur le comportement des rats des lots A et B a persisté. Ces derniers sont apparus très faibles, moins dynamiques et ont présenté une déshydratation qui s'est manifesté par une constipation et des selles dures. Le lot témoin n'a présenté aucun anomalie ou changement de comportement.

Tableau 5.15 : Etude statistique des résultats du poids corporel et la quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la quatrième semaine d'administration des métaux lourds et leurs significations.

Moyenne ± écartype	(1) Témoin / Lot A		(2) Témoin / Lot B		(3) Lot A / Lot B		Seuil de Significativité p < 0,05
Poids corporel (g)	233,83	184,00	233,83	185,50	184,00	185,50	(1) 0,0001***
	±	±	±	±	±	±	(2) 0,0002***
	7,35	17,38	7,35	19,48	17,38	19,48	(3) 0,4
Quantité d'aliment ingérée (g)	186,00	105,50	186,00	119,83	105,50	119,83	(1) 0,0001***
		±		±	±	±	(2) 0,0006***
		21,86		35,86	21,86	35,86	(3) 0,2

\*\*\* : Très hautement significative.

Pour l'évaluation pondérale des 3 lots pendant la quatrième semaine d'administration des métaux lourds et d'après les résultats du tableau 5.15, une grande différence hautement significative entre le lot témoin et les lots A et B. La différence du poids corporel entre le lot A et B est négligeable et non significative.

Concernant la quantité d'aliment ingérée par chaque lot des rats pendant la quatrième semaine d'administration des métaux lourds et d'après les données du tableau 5.15, nous avons les mêmes résultats que pour le poids corporel sauf que différence entre le lot A et B ici est considérable (11,95%).

### 2.1.3. Résultats des dix jours d'accouplement des rats sans administration des métaux lourds

Les résultats de suivi du poids corporel et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant les dix jours d'accouplement sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5.16 : Evaluation pondérale et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant les dix jours d'accouplement.

Lot	N°	Poids corporel (g)	Quantité d'aliment ingérée (g)
A	1	245	1634 g
	2	252	
	3	244	
	4	237	
	5	229	
	6	202	
	T	1409 g	1634 g
Moyenne ± écartype		234,83 ± 17,88	272,33
B	1	262	1847 g
	2	248	
	3	246	
	4	250	
	5	250	
	6	232	
	T	1488 g	1847 g
Moyenne ± écartype		248,00 ± 9,63	307,83
Témoin	1	267	844
	2	256	
	3	250	
	4	250	784
	5	237	
	6	234	
	T	1494 g	1628 g
Moyenne ± écartype		249,00 ± 12,19	271,33

Pendant les 10 jours d'accouplement, les lots A et B n'ont pas subi un traitement par les métaux lourds et par conséquent nous remarquons que les rats ont récupéré un peu et sont devenus plus hydratés et plus dynamiques, les rats du lot témoin ne présentent toujours aucun changement de comportement.

Tableau 5.17 : Etude statistique des résultats du poids corporel et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant les 10 jours d'accouplement et leurs significations.

Moyenne ± écartype	(1) Témoin / Lot A		(2) Témoin / Lot B		(3) Lot A / Lot B		Seuil de Significativité p < 0,05
Poids corporel (g)	249,00	234,83	249,00	248,00	234,83	248,00	(1) 0,07
	±	±	±	±	±	±	(2) 0,4
	12,19	17,88	12,19	9,63	17,88	9,63	(3) 0,07
Quantité d'aliment ingérée (g)							(1) 0,08
	371,33	272,33	371,33	307,83	272,33	307,83	(2) 0,0001***
							(3) 0,001***

\*\*\* : Très hautement significative.

Selon les résultats du tableau 5.17, l'évaluation pondérale des 3 lots pendant les 10 jours d'accouplement des rats sans l'administration des métaux lourds montre une différence non significative entre les 3 lots à cause de la grande prise de poids pour les lots A et B, surtout le lot le B qui a presque atteint le même poids que le lot témoin.

La différence entre le lot A et B n'est pas significative mais elle est un peu considérable (5,31%) cette augmentation en absence de traitement par les métaux lourds est due à la richesse nutritionnelle de la spiruline.

Concernant la quantité d'aliment ingérée par chaque lot des rats pendant les 10 jours d'accouplement et d'après les données du tableau 5.17, nous remarquons une grande augmentation dans la quantité d'aliment ingérée par les 3 lots surtout les lots A et B, cette augmentation est expliquée par la grande consommation d'eau lors de l'absence des métaux lourds.

Suite à cette augmentation la différence entre le lot témoin et le lot A est négligeable et non significative, alors que le lot B a montré une meilleure capacité de récupération du poids corporel, il dépasse le poids moyen du lot témoin et de lot A avec une différence hautement significative.

#### 2.1.4. Résultats de la période de gestation et administration des métaux lourds

##### 2.1.4.1. Résultats de la cinquième semaine d'administration des métaux lourds (la gestation)

Les résultats de suivi du poids corporel et la quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la cinquième semaine d'administration des métaux lourds sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5.18 : Evaluation pondérale et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la cinquième semaine d'administration des métaux lourds.

Lot	N°	Poids corporel (g)	Quantité d'aliment ingérée (g)
A	1	233	95
	2	236	85
	3	212	80
	4	225	75
	5	207	79
	6	180	76
	T	1293 g	490 g
Moyenne ± écartype		215,50 ± 29,79	81,66 ± 7,42
B	1	243	125
	2	236	102
	3	211	104
	4	242	131
	5	232	93
	6	216	90
	T	1380 g	645 g
Moyenne ± écartype		230,00 ± 13,49	107,00 ± 16,83
Témoin	1	305	555
	2	272	
	3	261	
	4	278	542
	5	260	
	6	256	
	T	1632 g	1097 g
Moyenne ± écartype		272,66 ± 18,14	182,83

Pendant la cinquième semaine d'administration des métaux lourds et après l'accouplement, tous les rats femelles sont considérées comme gestante, avec encore une administration des métaux lourds ( $\text{HgCl}_2$ : 0,15 ;  $\text{CdCl}_2$ : 100 ;  $\text{PbC}_4\text{H}_6\text{O}_4$ : 30 mg/rat/jr).

Les rats des lots : A et B sont apparus stressées, excitées et perturbées sous l'effet de la toxicité des métaux lourds, alors que les rats du lot témoin ne présentent aucun changement de comportement.

Tableau 5.19 : Etude statistique des résultats du poids corporel et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la cinquième semaine d'administration des métaux lourds et leurs significations.

Moyenne ± Ecartype	(1) Témoin / Lot A		(2) Témoin / Lot B		(3) Lot B / Lot B		Seuil de Significativité p < 0,05
	Poids corporel (g)	272,66 ± 18,14	215,50 ± 29,79	272,66 ± 18,14	230,00 ± 13,49	215,50 ± 29,79	
Quantité d'aliment ingérée (g)	182,83	81,66 ± 7,42	182,83	107,00 ± 16,83	81,66 ± 7,42	107,00 ± 16,83	(1) 0,0001*** (2) 0,0001*** (3) 0,003***

\*\*\* : Très hautement significative.

Pour l'évaluation pondérale des 3 lots pendant la cinquième semaine d'administration des métaux lourds et d'après les résultats du tableau 5.19, une grande chute du poids corporel avec une différence hautement significative entre le lot témoin et les lots : A et B est observé. C'est un signe de toxicité sous l'effet des doses élevés de métaux lourds administrées.

La différence de poids corporel entre le lot B et lot A n'est pas significative statistiquement mais elle n'est pas négligeable (6,30%).

Concernant la quantité d'aliment ingérée par chaque lot, et d'après les données du tableau 5.19, nous avons remarqué une différence hautement significative entre le lot témoin et les lots : A et B, avec une différence hautement significative entre le lot A et B d'où l'effet de la spiruline est très claire.

### 2.1.4.2. Résultats de la sixième semaine d'administration des métaux lourds

Les résultats de suivi du poids corporel et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la sixième semaine d'administration des métaux lourds sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5.20 : Evaluation pondérale et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la sixième semaine d'administration des métaux lourds.

Lot	N°	Poids corporel (g)	Quantité d'aliment ingérée (g)
A	1	228	90
	2	222	91
	3	198	105
	4	190	76
	5	188	90
	6	154	72
	T	1180 g	524 g
Moyenne ± écartype		196,66 ± 14,00	87,33 ± 11,86
B	1	240	130
	2	230	100
	3	207	94
	4	235	90
	5	213	76
	6	198	76
	T	1323 g	566 g
Moyenne ± écartype		220,50 ± 16,88	94,33 ± 19,97
Témoin	1	261	589
	2	309	
	3	295	
	4	247	582
	5	308	
	6	290	
	T	1710 g	1171 g
Moyenne ± écartype		285,66 ± 25,49	195,16

A la fin de la sixième semaine d'administration des métaux lourds nous avons enregistré des mises bas de trois femelles (B 1, Témoin 1 et 4). Le lot témoin n'a présenté aucun changement de comportement.

Les rats du lot A sont toujours stressées, excitées et perturbées. La chose la plus importante à noter c'est que les rats du lot B nourris par l'aliment enrichi en spiruline ont montré un comportement plus calme que les rats du lot sans spiruline.

Tableau 5.21 : Etude statistique des résultats du poids corporel et quantité des rats pendant la sixième semaine d'administration des doses des métaux lourds et leurs significations.

Moyenne ± écartype	(1) Témoin / Lot A		(2) Témoin / Lot B		(3) Lot A / Lot B		Seuil de Significativité p < 0,05
	Poids corporel (g)	285,66 ± 25,49	196,66 ± 14,00	285,66 ± 25,49	220,50 ± 16,88	196,66 ± 14,00	
Quantité d'aliment ingérée (g)	195,16	87,33 ± 11,86	195,16	94,33 ± 19,97	87,33 ± 11,86	94,33 ± 19,97	(1) 0,0001*** (2) 0,0001*** (3) 0,2

\* : Significative

\*\*\* : Très hautement significative.

D'après les résultats du tableau 5.21, la différence du poids corporel est toujours hautement significative entre le lot témoin et les lots A et B. Aussi, la différence du poids corporel entre le lot A et B est significative, c'est là où nous avons noté l'effet de la spiruline sur le poids corporel des rats.

Concernant la quantité d'aliment ingérée par chaque lot, nous avons les mêmes résultats que pour le poids corporel sauf que différence entre le lot A et B ici est considérable.

### 2.1.4.3. Résultats de la septième semaine d'administration des métaux lourds

Les résultats de suivi du poids corporel et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la septième semaine d'administration des métaux lourds sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5.22 : Evaluation pondérale et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la septième semaine d'administration des métaux lourds.

Lot	N°	Poids corporel (g)	Quantité d'aliment ingérée (g)
A	1	220	85
	2	199	85
	3	198	90
	4	190	70
	5	188	85
	6	154	70
	T	1149 g	485 g
Moyenne ± écartype		191,50 ± 21,59	80,83 ± 8,61
B	1	230	120
	2	215	100
	3	207	92
	4	224	98
	5	213	72
	6	198	70
	T	1287 g	552 g
Moyenne ± écartype		214,50 ± 11,50	92,00 ± 18,80
Témoin	1	287	316
	2	270	250
	3	250	215
	4	267	230
	5	346	250
	6	244	210
	T	1644 g	1471 g
Moyenne ± écartype		277,33 ± 36,95	245,16 ± 38,57

Au cours de la septième semaine d'administration des métaux lourds nous avons marqué la mises bas des six femelles gestantes (B 2 et 4 ; Témoin 2, 3, 5 et 6). Le lot témoin n'a présenté aucun changement ou anomalie de comportement dans les mises bas et la lactation, les rats du lot A sont restés stressées, excitées et perturbées et nous avons noté un avortement de la seul femelle gestante sous l'effet de la toxicité des métaux lourds.

Aussi, pendant cette semaine les rats du lot B ont présenté un comportement plus calme que les rats du lot A lors de la manipulation.

Tableau 5.23 : Etude statistique des résultats du poids corporel et quantité d'aliment ingérée par les rats pendant la septième semaine d'administration des métaux lourds et leurs significations.

Moyenne ± écartype	(1) Témoin / Lot A		(2) Témoin / Lot B		(3) Lot A / Lot B		Seuil de Significativité p < 0,05
Poids corporel (g)	277,33	191,50	277,33	214,50	191,50	214,50	(1) 0,0003***
	±	±	±	±	±	±	(2) 0,001***
	36,95	21,59	36,95	11,50	21,59	11,50	(3) 0,02**
Quantité d'aliment ingérée (g)	245,16	80,83	245,16	92,00	80,83	92,00	(1) 0,0001***
	±	±	±	±	±	±	(2) 0,0001***
	38,57	8,61	38,57	18,80	8,61	18,80	(3) 0,1

\* : Significative.      \*\* : Très significative      \*\*\* : Très hautement significative.

D'après les résultats du tableau 5.21, ce sont les mêmes résultats que ceux obtenus lors de la sixième semaine, sauf que la différence de poids corporel moyen entre le lot A et B est très significative. L'effet de la spiruline sur le poids corporel des rats est apparent.

A la fin de l'expérimentation, en comparant le poids corporel moyen des rats témoins avec la courbe d'évaluation pondérale de la figure 5.4, nous avons remarqué que le poids de nos rats est dans les normes et correspond à leur âge qui est environ 21 semaines. Cela indiquerait que nos rats sont en bonne santé, bien nourris et bien portants. Aussi, notre aliment a semblé avoir couvert les besoins nutritionnels de nos rats, et nos résultats sont fiables.

Concernant la quantité d'aliment ingérée par chaque lot, nous avons les mêmes résultats que pour le poids corporel sauf que la différence entre le lot A et B ici est plus considérable (12,14 %).

Au vu de tous les résultats de l'évaluation pondérale de la quantité d'aliment ingéré et du comportement des 3 lots des rats femelles adultes pendant les dix semaines d'expérimentation nous pourrions dire que:

- Une toxicité subaiguë par voie orale des doses supplémentaires du chlorure de mercure(II), chlorure de cadmium et l'acétate de plomb(II) s'est manifesté chez les rats femelles par :
  - ✓ Une perturbation de comportement avec un stress, une excitation, une déshydratation, constipation et faiblesse.
  - ✓ Une grande diminution du poids corporel allant jusqu'à 31,15%.
  - ✓ Une perte d'appétit qui se traduit par une grande diminution de la quantité d'aliment ingérée par les rats allant jusqu'à 30,94%.
- Un effet bénéfique de la spiruline contre les effets toxiques observés chez les rats femelles est mise en évidence par :
  - ✓ Diminution de la perturbation de comportement. La spiruline semble avoir un effet calmant très apparent sur les rats.
  - ✓ Une augmentation du poids corporel des rats allant jusqu'à 10,81%, avec une grande capacité de récupération et de prise de poids en absence des métaux lourds.
  - ✓ Stimulation de l'appétit qui s'est traduit par une augmentation de la quantité d'aliment ingérée allant jusqu'à 23,83%.

Nos résultats sont en accord avec ceux présentés par Razafindra Jaona et *al* (2008) concernant l'influence bénéfique de la spiruline sur la croissance et l'appétit, par l'incorporation son dans la nourriture des poulets de chair. [105].

## 2.2. Résultats de la reproduction des rats

Les résultats montrant l'effet des métaux lourds et la spiruline sur la reproduction des rats sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5.24 : Résultats de l'effet des métaux lourds et la spiruline sur la reproduction des rats.

Lot	N°	Fertilité	Pré-natalité	Nombre de ratons	Mortalité
A	1	-	-	-	-
	2	+	+	12	12
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
	6	-	-	-	-
B	1	+	-	10	02
	2	-	-	-	-
	3	+	-	07	01
	4	+	-	10	03
	5	-	-	-	-
	6	-	-	-	-
Témoin	1	+	-	07	01
	2	+	-	11	00
	3	+	-	10	00
	4	+	-	14	01
	5	+	-	12	01
	6	+	-	09	00

(+) : Présence      (-) : Absence

Dans notre étude sur l'effet de la spiruline sur la toxicité des métaux lourds, les paramètres étudiés sont : la fertilité, périnatalité, le nombre des ratons par mise bas et le taux de mortalité.

Chez les rats, la puberté survient entre 50 et 60 jours après la naissance chez les deux sexes, l'ouverture du vagin se produisant habituellement deux semaines plus tard. Les rattes sont polyoestriennes et elles acceptent le mâle à tous les 4 ou 5 jours au moment de l'ovulation qui dure chaque fois de 12-14 heures. La gestation durée de 21-23 jours [106].

Selon ces données, toutes les rates femelles des 3 lots ainsi les mâles utilisés pour l'accouplement sont des rats adultes déjà arrivés au stade de la puberté et capable d'avoir une gestation normale, la durée de gestation (10 jours) est largement suffisante pour que toutes les femelles soit gestantes.

D'après les résultats du tableau 5.24, nous avons remarqué chez le lot témoin, un taux de fertilité de 100 % où toutes les six femelles du lot sont gestantes, ce qui confirme que les rats sont en bonne santé bien nourries et bien portantes et l'alimentation est équilibrée, de même que les conditions d'accouplement sont favorables, aucun cas de pré-natalité n'a été remarqué au long de la période de gestation des témoins, le nombre des ratons varie entre 7-14 ratons avec un moyenne de 10 ratons, avec un taux de mortalité de 3 ratons sur 63 ratons c'est-à-dire 4,76 %.

Concernant le lot A. Le mercure, le cadmium et le plomb sont considérés comme toxines reproductrices. Le Chlorure de Mercure(II) est une toxine reproductrice, excrété dans le lait maternel chez l'animal [107].

Le Chlorure de Cadmium traverse le placenta, excrété dans le lait maternel, c'est une embryotoxique et/ou foetotoxique chez l'animal. Peut causer des malformations congénitales au fœtus [108].

L'acétate de plomb(II) est une toxine reproductrice, tératogène, cancérigène. Peut causer: atteinte testiculaire, stérilité, anomalies spermatiques, désordres menstruels, effets néfastes sur l'aptitude générale à la reproduction, traverse la barrière placentaire (peut causer des malformations à la naissance, des mortalités fœtales, des développements retardés du fœtus, et atteint le développement post-natal), excrété dans le lait maternel chez l'animal [109].

D'après les résultats du tableau 5.24, nous avons observé une très faible fertilité chez le lot A par rapport au lot témoin avec un taux de 1/6 c'est-à-dire un taux de 16,66 %. Cette diminution est due aux effets des métaux lourds déjà cités surtout l'acétate de plomb qu'est un toxique reproducteur très puissant, la seule femelle gestante dans le lot A a subi un avortement c'est-à-dire pré-natalité dans le 17<sup>ème</sup> jour de la gestation sous l'effet des doses de métaux lourds, la perte du poids corporel qu'a subi cette femelle, a compliqué la situation et elle a fini par avorter et il y a eu la mort de 12 fœtus.

Concernant le lot B et d'après les résultats du tableau 5.24, nous avons obtenu un taux de fertilité de 3/6. La comparaison de ce résultat avec celui de lot témoin et le lot A, montre que les métaux lourds ont induit la diminution de la fertilité et à l'inverse a spiruline la augmenté.

Chez les 3 femelles gestantes, aucun cas de pré-natalité n'a été remarqué, et après mise bas le nombre des ratons obtenus varie entre 7-10 ratons avec une moyenne de 9 ratons.

En effet, le taux de mortalité a été de 5 ratons sur 27 ratons c'est-à-dire 18,51%, ces résultats sont un peu plus important que pour leur le lot témoin.

Il ressort des résultats liés à la reproduction que le chlorure de mercure(II), le chlorure de cadmium et l'acétate de plomb(II) sont des toxiques reproducteurs puissants entraînant une grande diminution de la fertilité chez les femelles. Ils traverseraient probablement la barrière de placenta provoquant une foetotoxique grave, alors que la spiruline semblerait produire une protection des foetus contre la toxicité orale du mercure, cadmium et plomb.

Il est à noter que des études sur les poissons d'aquarium tels le *Xiphophorus helleri* (James et al. 2006) et la crevette *Fenneropenaeus chinensis* (Kim et al. 2006) ont montré les effets bénéfiques de *Spirulina platensis* sur la fertilité [110 et 111].

## 2.3. Résultats des analyses biochimiques du sang des rats

### 2.3.1. Résultats de l'étude statistique des analyses biochimiques de l'évaluation d'activité rénale

Les résultats d'étude statistique des analyses biochimiques de l'évaluation de l'activité rénale des trois lots sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5.25 : Etude statistique des résultats d'analyses biochimiques de l'évaluation d'activité rénale.

	Urée (g/L)		Créatinine (g/L)		Acide urique (g/L)	
	(1) Témoin / Lot A	0,54 ± 0,02	0,82 ± 0,04	7,05 ± 0,48	10,16 ± 0,33	16 ± 1,08
(2) Témoin / Lot B	0,54 ± 0,02	0,63 ± 0,05	7,05 ± 0,48	8,06 ± 0,46	16 ± 1,08	22,16 ± 1,94
(3) Lot A / Lot B	0,82 ± 0,04	0,63 ± 0,05	10,16 ± 0,33	8,06 ± 0,46	30,66 ± 1,96	22,16 ± 1,94
Seuil de Significativité p < 0,05	(1)	0,0001***	0,0001***		0,0001***	
	(2)	0,0047***	0,0021***		0,0001***	
	(3)	0,0001***	0,0001***		0,0001***	

\*\*\* : Très hautement significative.

Les reins exercent un grand nombre de fonctions primordiales dans l'organisme des mammifères, parmi ces fonctions essentielles la filtration du sang et la formation des urines par l'excrétion des produits de dégradation du métabolisme cellulaire tel que la créatinine, l'urée et l'acide urique [112].

Dans le but d'évaluer l'effet toxique des métaux lourds ainsi que l'effet protecteur de la spiruline sur l'activité rénale nous avons dosé le taux sérique de la créatinine, l'urée et l'acide urique dans le sang des rats.

La créatinine est un déchet azoté non protéique, dérivé de la créatine formée à partir des acides aminés, métabolisés dans les muscles [113]. La créatinine inutilisable par le muscle, passe dans la circulation sanguine, elle est éliminée en majeure partie par les reins. Son augmentation sanguine est généralement liée à une altération rénale [114].

Le chlorure de mercure(II), chlorure de cadmium et l'acétate de plomb(II) sont considérés comme des toxines rénaux qui provoquent des dommages ou insuffisance rénale, avec des néphropathies, et néphrite [107,108 et 109].

Les xénobiotique (polluants, pesticides...) inhibent l'incorporation des acides aminés dans les protéines causant une augmentation les niveaux sanguins de la créatinine, l'urée et l'acide urique [116].

En ce qui concerne le taux sérique de la créatinine ou la créatinémie, et d'après les résultats du tableau 5.25, tous les résultats sont hautement significatifs.

La différence est hautement significative entre la valeur moyenne de lot témoin avec celle des lots A et B, mais la différence est plus grande entre le lot A par rapport au lot B,

Comme la créatinémie est considérée comme étant le meilleur marqueur endogène de la filtration glomérulaire et du bon fonctionnement rénal [115]. La différence pourrait être expliquée par une perturbation de l'activité rénale suite à une altération sous l'effet de la toxicité des métaux lourds.

Mais cette altération est moins importante chez le lot B puisque la différence de la valeur moyenne de la créatinémie est aussi hautement significative entre le lot A et B et c'est que là l'effet de la spiruline est observé.

L'urée est la principale forme de la dégradation de l'ammoniaque issue des composés azotés non protéiques [117]. Sa production se déroule essentiellement dans le foie et en faible quantité par les reins à partir de la circuline et la

l'hydrolyse de l'arginine. Son augmentation sanguine est généralement liée à une altération rénale [113].

Ainsi, concernant le taux sérique de l'urée ou l'urémie, et d'après les résultats du tableau 5.25, tous les résultats sont hautement significatifs.

La différence est hautement significative entre la valeur moyenne de l'urémie de lot témoin avec celle des lots : A et B, mais la différence est plus grande pour le lot A par rapport au lot B.

D'après les résultats de l'urémie et la créatinémie chez les rats traités par les métaux lourds, une installation d'insuffisance rénale transitoire a été observée, il s'agit d'un signe de la néphrotoxicité [118].

Mais cette insuffisance rénale est moins importante chez le lot B puisque la différence de la valeur moyenne de l'urémie est aussi hautement significative entre le lot A et B et là nous avons remarqué l'effet de la spiruline.

L'acide urique est le produit terminal du catabolisme des bases puriques, formé par le foie éliminé par les reins. Son augmentation dans le sang est généralement liée à une altération rénale [119].

Pour le taux sérique de l'acide urique ou l'uricémie, et d'après les résultats du tableau 5.25, tous les résultats sont hautement significatifs, de la même façon que pour l'urémie et la créatinémie.

Les résultats de l'uricémie permettent de confirmer les résultats de l'urémie et la créatinémie concernant l'altération rénale et l'effet positif de la spiruline.

### 2.3.2. Résultats de l'étude statistique des analyses biochimiques de l'évaluation d'activité hépatique

Les résultats de l'étude statistique des analyses biochimiques de l'évaluation d'activité hépatique des trois lots sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 5.26 : Etude statistique des résultats d'analyses biochimiques de l'évaluation d'activité hépatique et leurs significations.

	Cholestérol Total		Triglycérides	
(1) Témoin / Lot A	0,83 ± 0,06	0,59 ± 0,05	0,76 ± 0,09	0,59 ± 0,05
(2) Témoin / Lot B	0,83 ± 0,06	0,71 ± 0,05	0,76 ± 0,09	0,61 ± 0,06
(3) Lot A / Lot B	0,59 ± 0,05	0,71 ± 0,05	0,59 ± 0,05	0,61 ± 0,06
Seuil de Significativité p < 0,05	(1)	0,0001***	0,0001***	
	(2)	0,0047***	0,0034***	
	(3)	0,0018***	0,0002***	

\*\*\* : Très hautement significative.

Le foie est la plus grande glande dans l'organisme humain et chez la plupart des mammifères. Le foie exerce un grand nombre de fonctions primordiales dans l'organisme, parmi ces fonctions biochimiques essentielles la synthèse du cholestérol, les lipoprotéines plasmatiques et les triglycérides [120].

Dans le but de l'évaluation de l'effet toxique des métaux lourds ainsi l'effet protecteur de la spiruline sur l'activité hépatique, nous avons dosé le taux sérique du cholestérol total et des triglycérides dans le sang des rats.

Le chlorure de mercure(II), le chlorure de cadmium et l'acétate de plomb(II), sont considérés comme toxines hépatiques provoquant des dommages et dysfonctionnement du foie [107, 108 et 109].

Concernant le cholestérol total et selon les résultats du tableau 5.26, nous avons constaté que la différence est hautement significative entre la valeur moyenne du cholestérol du lot témoin et celle des lots : A et B. La différence est plus grande pour le lot A par rapport à lot B, et en même temps la différence entre le lot A et B est aussi hautement significative, cela est expliqué par une altération de l'activité hépatique chez les rats du lot A sous l'effet des 3 métaux lourds et une amélioration de l'activité hépatique chez les rats du lots B sous l'effet de la spiruline.

Pour les triglycérides et selon les résultats du tableau 5.26, nous avons remarqué que les résultats sont hautement significatifs et la différence est interprétée de la même façon que pour le cholestérol total.

Les résultats des triglycérides permettent de confirmer les résultats du cholestérol total pour l'altération hépatique et l'effet de la spiruline.

D'après l'interprétation des résultats des analyses biochimiques du sang des trois lots de rats femelles adultes après les dix semaines d'expérimentation nous pourrions dire ce qui suit :

- Une toxicité subaiguë par voie orale des doses supplémentaires de chlorure de mercure(II), chlorure de cadmium et l'acétate de plomb(II) se manifeste chez les rats femelles par :
  - ✓ Une installation d'insuffisance rénale transitoire qui est un signe de la néphrotoxicité avec une augmentation dans la créatinémie (30,85 %), l'urémie (34,14 %) et l'uricémie (47,81 %).
  - ✓ Une perturbation et altération de l'activité hépatique avec une augmentation du cholestérol total (28,91 %) et les triglycérides sériques (22,36 %).
- Un effet bénéfique de la spiruline contre les effets toxiques est observé chez les rats femelles par :
  - ✓ Diminution de l'altération de l'activité rénale et de la néphrotoxicité avec une diminution dans la créatinémie (23,96 %), l'urémie (23,17 %) et l'uricémie (27,72 %), où la spiruline semble avoir un effet protecteur sur les reins et l'activité rénale.

- ✓ Diminution de la perturbation de l'activité hépatique avec une diminution du cholestérol total (16,90 %) et les triglycérides sériques (3,27 %), où la spiruline semble avoir un effet protecteur sur le foie et l'activité hépatique.

Nos résultats sont en accord avec les résultats de l'étude japonaise de Hideki, F., et al (2011) où la spiruline a permis de diminuer le dysfonctionnement rénal causé par le chlorure mercurique.

## 2. 4. Résultats des analyses Hématologiques du sang des rats

### 2.4.1. Résultats des analyses de la Formule de Numération Sanguine (FNS) des paramètres érythrocytaires

Les résultats de l'étude statistique de la formule de numération sanguine (paramètres érythrocytaires) des trois lots sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5.27 : Etude statistique des résultats de la formule numération sanguine (paramètres érythrocytaires) et leurs significations.

	(1) Témoin / Lot A		(2) Témoin / Lot B		(3) Lot A / Lot B		Seuil de Significativité $p < 0,05$
Erythrocytes ( $10^6/\text{ul}$ )	8,87 ± 0,51	5,33 ± 0,59	8,87 ± 0,51	7,42 ± 0,56	5,33 ± 0,59	7,42 ± 0,56	(1) 0,0001*** (2) 0,0004*** (3) 0,0001***
Hémoglobine (g/dl)	15,98 ± 0,9	11,99 ± 0,86	15,98 ± 0,9	14,76 ± 1,01	11,99 ± 0,86	14,76 ± 1,01	(1) 0,0001*** (2) 0,03* (3) 0,0002***
Hématocrite (%)	44,14 ± 2,16	31,60 ± 2,32	44,14 ± 2,16	40,54 ± 3,03	31,60 ± 2,32	40,54 ± 3,03	(1) 0,0001*** (2) 0,01** (3) 0,0001***
VGM (fl)	53,75 ± 3,85	43,04 ± 3,08	53,75 ± 3,85	44,06 ± 4,25	43,04 ± 3,08	44,06 ± 4,25	(1) 0,0001*** (2) 0,001*** (3) 0,3
TCMH (pg)	19,45 ± 1,11	16,51 ± 1,19	19,45 ± 1,11	17,75 ± 1,28	16,51 ± 1,19	17,75 ± 1,28	(1) 0,0002*** (2) 0,005*** (3) 0,5
CCMH (g/dl)	36,2 ± 2,43	32,35 ± 1,45	36,2 ± 2,43	33,09 ± 1,84	32,35 ± 1,45	33,09 ± 1,84	(1) 0,003*** (2) 0,01** (3) 0,2

**VGM** : Volume Globulaire Moyen. / **TCMH** : Concentration moyenne en hémoglobine. / **CCMH** : Concentration Corpusculaire Moyenne en Hématies.

\* : significative    \*\* : Hautement significative    \*\*\* : Très hautement significative.

Le chlorure de cadmium provoque des désordres sanguins. L'acétate de plomb(II) est considéré comme toxine hématologique qui provoque des altérations dans la formation des globules rouges, diminution de l'hémoglobine, et l'anémie [108 et 109].

Selon les résultats du tableau 5.27 nous notons :

- Une diminution hautement significative du nombre des érythrocytes (globules rouges), hémoglobine et hématocrite chez les rats du lot A par rapport à lot témoin, cette dernière est expliquée par une anémie sévère considérée comme un signe de toxicité des métaux lourds sur tout le plomb.
- Entre les rats du lot B et le lot témoin, la différence est hautement significative pour les érythrocytes, significative pour l'hémoglobine et très significative pour l'hématocrite, d'après ces résultats nous avons conclu que l'anémie chez les rats avec spiruline est moins sévère.
- Entre les rats du lot A et B, la différence est hautement significative pour les érythrocytes, l'hémoglobine et l'hématocrite, ces résultats sont expliqués par une diminution considérable de l'anémie chez les rats du lot B par rapport à lot A, ici nous avons constaté l'effet protecteur de la spiruline sur les globules rouges.
- La détermination de VGM, TCMH et CCMH est dans le but d'évaluer le type d'anémie, et d'après les résultats du tableau 5.27, nous avons constaté une anémie microcytaire hypochrome exprimé par une diminution de volume des globules rouges et une diminution du fer dans l'hémoglobine [121], chez les deux lots de rats A et B.

Nos résultats sont en accord avec les résultats de l'étude réalisée par Zhang, H.Q., et al (2001) sur l'effet protecteur des polysaccharides de la *Spirulina platensis* sur le système hématopoïétique et les globules rouges [122].

### 2.4.2. Résultats des analyses de la Formule Numération Sanguine (FNS) des paramètres leucocytaires et les plaquettes sanguines

Les résultats de l'étude statistique de la formule numération sanguine (paramètres leucocytaires et les plaquettes sanguines) sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5.28 : Etude statistique des résultats de la formule numération sanguine (paramètres leucocytaires et les plaquettes) et leurs significations.

	(1) Témoin / Lot A		(2) Témoin / Lot B		(3) Lot A / Lot B		Seuil de Significativité $p < 0,05$
Leucocytes ( $10^3/\text{ul}$ )	9,65	10,43	9,65	11,86	10,43	11,86	(1) 0,016**
	$\pm$ 0,57	$\pm$ 0,5	$\pm$ 0,57	$\pm$ 0,43	$\pm$ 0,5	$\pm$ 0,43	(2) 0,0001***
							(3) 0,0002***
Lymphocytes (%)	86,56	87,18	86,56	89,2	87,18	89,2	(1) 0,079
	$\pm$ 1,58	$\pm$ 0,84	$\pm$ 1,58	$\pm$ 0,57	$\pm$ 0,84	$\pm$ 0,57	(2) 0,0005***
							(3) 0,0003***
Monocytes (%)	2,71	2,16	2,71	1,43	2,16	1,43	(1) 0,123
	$\pm$ 0,91	$\pm$ 0,4	$\pm$ 0,91	$\pm$ 0,25	$\pm$ 0,4	$\pm$ 0,25	(2) 0,003***
							(3) 0,001***
Granulocytes (%)	11,21	10,6	11,21	9,82	10,6	9,82	(1) 0,139
	$\pm$ 1,2	$\pm$ 0,54	$\pm$ 1,2	$\pm$ 0,51	$\pm$ 0,54	$\pm$ 0,51	(2) 0,002***
							(3) 0,0007***
Plaquettes ( $10^3/\text{ul}$ )	658,33	806,16	658,33	804,33	806,16	804,33	(1) 0,0001***
	$\pm$ 33	$\pm$ 32	$\pm$ 33	$\pm$ 38	$\pm$ 32	$\pm$ 38	(2) 0,0001***
							(3) 0,4

\*\* : Hautement significative    \*\*\* : Très hautement significative.

Les leucocytes ou globules blancs constituent le système immunitaire dans l'organisme, et d'après les résultats du tableau 5.28 nous avons remarqué :

- Une augmentation très significative dans le nombre moyen de leucocytes pour les rats du lot A par rapport au lot témoin, cette augmentation est due à une réponse immunitaire que le corps a établi pour combattre la toxicité des métaux lourds.

- Une différence hautement significative dans le nombre moyen de leucocytes entre les rats du lot B et le lot témoin et entre le lot B et A, cette augmentation peut être expliquée par la stimulation du système immunitaire par la spiruline.
  
- Pour les rats du lot A, une augmentation statistiquement non significative dans le pourcentage moyen des lymphocytes, monocytes et granulocytes.
  
- Une différence hautement significative dans le pourcentage moyen des lymphocytes, monocytes et granulocytes entre les rats du lot B et le lot témoin et entre le lot B et A, cette augmentation confirme la stimulation du système immunitaire par la spiruline.
  
- Concernant les plaquettes sanguines, nous avons presque les mêmes résultats pour les deux lots A et B, avec une augmentation hautement significative par rapport à lot témoin. Cette augmentation provoque une rapidité dans la coagulation du sang, et la formation d'un thrombus obturant un vaisseau sanguin peut être considéré comme un signe de toxicité. La spiruline n'a pas d'effet sur les plaquettes sanguines.

Nos résultats sont en accord avec les résultats de l'étude réalisée par Watanuki et *al.* (2006) où la Spiruline est ajoutée aux granulés dans la nourriture des poissons d'élevage, plus souvent soumis à des infections virales et/ou bactériennes que les poissons sauvages, ont mis en évidence l'effet immunostimulant de *Spirulina platensis* chez la carpe *Cyprinus carpio* [123].

Après l'interprétation des résultats des analyses Hématologique du sang des rats femelles adultes après les 10 semaines d'expérimentation nous avons conclu :

- Une toxicité subaiguë par voie orale des doses supplémentaires de chlorure de mercure(II), chlorure de Cadmium et l'acétate de plomb(II) s'est manifesté chez les rats femelles par :

- ✓ Une anémie microcytaire hypochrome avec une diminution de nombre des érythrocytes (39,98 %), d'hémoglobine (24,54 %), et d'hématocrite (28,40 %).
- ✓ Une augmentation du nombre des leucocytes (7,47 %) suite à une réponse immunitaire contre la toxicité des métaux lourds.
  
- ✓ Une augmentation dans le nombre des plaquettes sanguines (18,33 %).
  
- Un effet bénéfique de la spiruline contre les effets toxiques observés chez les rats femelles par :
  - ✓ Une diminution de l'anémie érythrocytaire avec une augmentation du nombre des érythrocytes (28,16 %), d'hémoglobine (18,76 %), et d'hématocrite (22,05 %).
  - ✓ Une stimulation du système immunitaire avec une augmentation du nombre des leucocytes (12,05 %) à savoir les lymphocytes, monocytes et granulocytes.
  - ✓ La spiruline n'a pas d'effet sur les plaquettes sanguines où la différence est négligeable (0,22 %).

## 2. 5. Résultats de l'étude histopathologique des organes de rats

### 2.5.1. Résultats de l'examen macroscopique des organes de rats

Les résultats de l'examen macroscopique des organes de rats sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5.29 : Résultats de l'examen macroscopique des organes de rats.

Lot	N°	Poids corporel (g)	Poids des organes (g)			Apparence des organes
			foie	Poumon	reins	
A	1	228	10,213	2,867	1,889	+ des taches rouges sur le foie, + des gazes dans le côlon
	2	199	8,076	2,156	1,765	+des taches jaune sur le foie et brunes sur les poumons, + des gazes dans l'estomac
	3	198	7,901	2,234	2,055	+des taches brunes sur le foie et poumons, + des gazes dans tous le tube digestif
	4	190	7,981	2,298	1,559	+ des taches rouges sur le foie et les poumons
	5	188	9,211	2,224	2,004	+ des taches brunes sur les poumons
	6	154	7,678	3,011	1,532	+ des taches rouges sur le foie les poumons + des gazes dans les intestins
B	1	231	11,457	3,008	2,544	Normale
	2	212	7,981	2,450	2,113	Couleur de foie claire
	3	207	7,802	1,505	1,254	Normale
	4	224	9,544	1,290	2,552	+ des taches blanches sur le foie
	5	213	9,244	2,561	2,459	+ des taches blanches sur le foie et brune sur poumons
	6	198	9,120	2,112	2,022	+ des taches blanches sur le foie et les poumons
Témoin	1	287	14,300	3,360	2,595	Normale
	2	270	12,534	2,350	2,371	
	3	250	11,445	2,122	2,119	
	4	267	14,213	2,255	2,199	
	5	346	10,220	2,444	2,240	
	6	244	9,550	2,378	1,599	

(+) : Présence.

Les résultats de l'examen macroscopique des organes de rats après dissection enregistrés dans le tableau 5.29 montrent une apparence normale des organes des rats témoins dans l'aspect et la couleur (Figure 5.5)

Par contre, les rats du lot A présentent des anomalies au niveau de certains organes vitaux surtout la présence des gaz au niveau du tube digestif (estomac et intestins) qui se manifestant par un gonflement très apparent chez 4/6 des rats traités, et dans les zones où on ne remarque pas de gonflement, les intestins sont vides et subissent un rétrécissement avec une couleur jaunâtre à cause de diminution de la quantité d'aliment ingérée (Figure 5.5), ces effets sont considérés comme signes de toxicité des 3 métaux lourds.

Mais chez les rats du lot B, aucun gaz ou gonflement n'a été constaté et les intestins sont vides et subissent un rétrécissement à cause de la diminution de la quantité d'aliment ingérée.

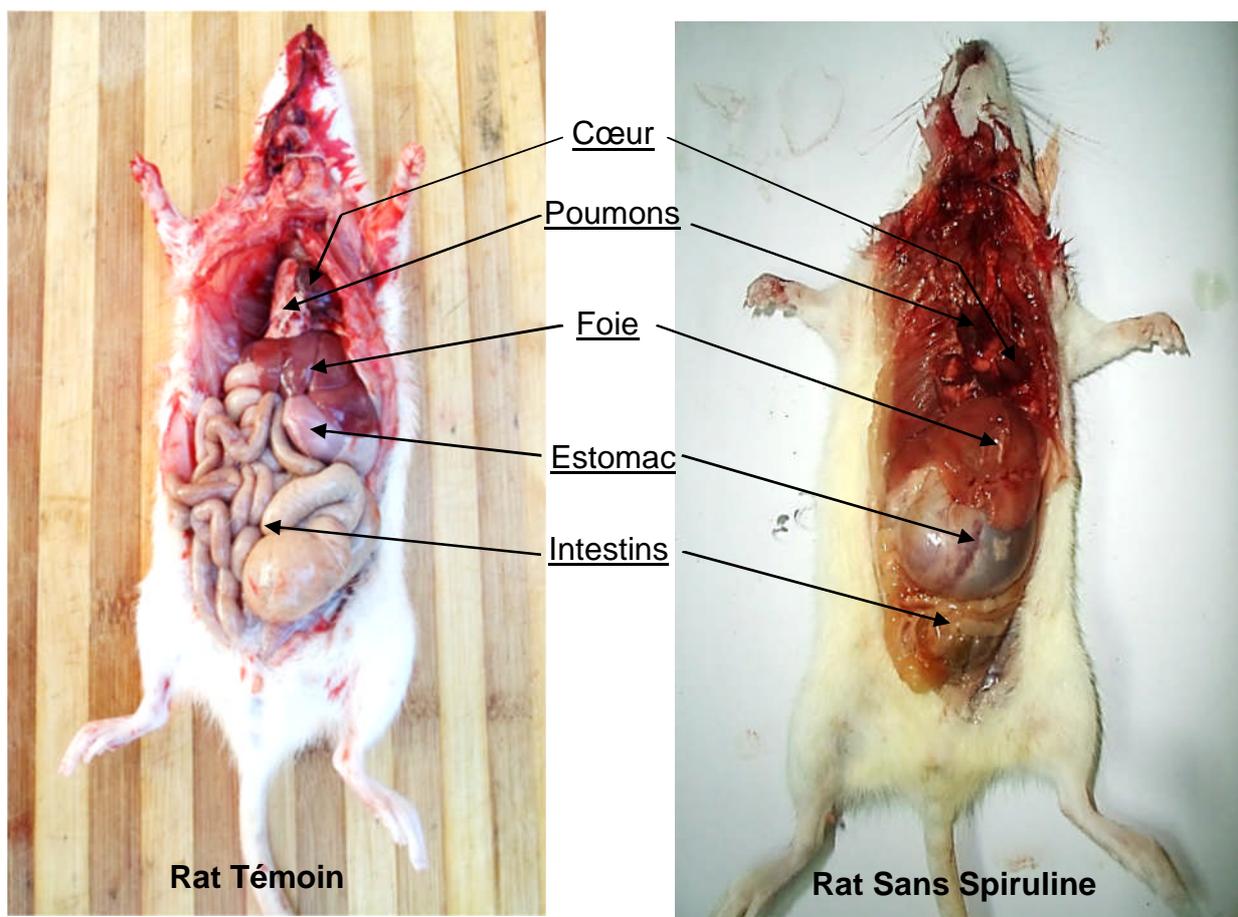


Figure 5.5 : Comparaison entre les organes d'un rat du lot A et un témoin (photo originale).

Pour le foie, les rats du lot A présentent des taches rouges et brunes sur le foie et les rats du lot B présentent par fois des taches blanches, qui n'a pas vraiment une grande signification sur le plan macroscopique.

Pour les poumons, les rats du lot A et B présentent des taches blanches, rouges et généralement brunes sur les poumons, qui peuvent être due à l'inflammation causée par les métaux lourds.

#### 2.5.1.1. Résultats de l'étude statistique de poids absolu et relatif du foie des 3 lots

Les résultats de l'étude statistique de poids absolu et relatif du foie et leurs significations des trois lots sont enregistrés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5.30 : Etude statistique des résultats du poids absolu et relatif du foie des 3 lots et leurs significations.

Poids	Foie						Seuil de Significativité $p < 0,05$
	(1) Témoin / Lot A		(2) Témoin / Lot B		(3) Lot A / Lot B		
Absolu (g)	12,043	8,510	12,043	9,190	8,510	9,190	(1) 0,001***
	$\pm$ 1,859	$\pm$ 0,600	$\pm$ 1,859	$\pm$ 0,790	$\pm$ 0,600	$\pm$ 0,790	(2) 0,007***
							(3) 0,1
Relatif (g%)	4,398	4,435	4,398	4,282	4,435	4,282	(1) 0,4
	$\pm$ 0,912	$\pm$ 0,371	$\pm$ 0,912	$\pm$ 0,493	$\pm$ 0,371	$\pm$ 0,493	(2) 0,3
							(3) 0,2

\*\*\* : Très hautement significative.

D'après les résultats du tableau 5.30 nous avons remarqué une différence du poids absolu hautement significative entre le lot témoin et les lots : A et B, cette différence est due à l'effet toxique des métaux lourds sur le foie, la différence du poids absolu est non significative entre le lot A et B, alors aucun effet de la spiruline n'a été observé.

Tous les résultats du poids relatif ne sont pas significatifs du point de vue statistique.

### 2.5.1.2. Résultats de l'étude statistique du poids absolu et relatif des reins des 3 lots

Les résultats de l'étude statistique du poids absolu et relatif des reins et leurs significations des trois lots sont enregistrés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5.31 : Etude statistique des résultats du poids absolu et relatif des reins des 3 lots et leurs significations.

Poids	Reins						Seuil de Significativité $p < 0,05$
	(1) Témoin / Lot A		(2) Témoin / Lot B		(3) Lot A / Lot B		
Absolu (g)	2,187	1,800	2,187	2,157	1,800	2,157	(1) 0,01**
	±	±	±	±	±	±	(2) 0,4
	0,332	0,221	0,493	0,496	0,221	0,493	(3) 0,06
Relatif (g %)	0,792	0,938	0,792	1,002	0,938	1,002	(1) 0,02*
	±	±	±	±	±	±	(2) 0,02*
	0,101	0,116	0,101	0,228	0,116	0,228	(3) 0,2

\* : Significative      \*\* : Hautement significative.

En ce qui concerne les reins et d'après les résultats mentionnés dans le tableau 5.31 nous avons remarqué :

- Une différence du poids absolu très significative entre le lot témoin et le lot A.
- Une différence du poids relatif est significative entre le lot témoin et les lots : A et B.

Cette différence est due à l'effet toxique des métaux lourds sur les reins.

- Les différences du poids absolu et relatif sont pas significatives entre le lot A et B, alors aucun effet de la spiruline n'a été constaté.

### 2.5.1.3. Résultats de l'étude statistique du poids absolu et relatif des poumons des 3 lots

Les résultats de l'étude statistique du poids absolu et relatif des poumons et leurs significations des trois lots sont enregistrés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5.32 : Etude statistique du poids absolu et relatif des poumons des 3 lots et leurs significations.

Poids	Poumons						Seuil de Significativité $p < 0,05$
	(1) Témoin / Lot A		(2) Témoin / Lot B		(3) Lot A / Lot B		
Absolu (g)	2,484	2,465	2,484	2,394	2,465	2,394	(1) 0,4
	±	±	±	±	±	±	(2) 0,1
	0,443	0,372	0,443	0,374	0,372	0,374	(3) 0,1
Relatif (g %)	0,901	1,300	0,901	1,117	1,300	1,117	(1) 0,01**
	±	±	±	±	±	±	(2) 0,01**
	0,170	0,067	0,170	0,157	0,067	0,157	(3) 0,1

\*\* : Hautement significative.

Dans le cas des poumons et d'après la lecture des résultats enregistrés dans le tableau 5.32 nous avons constaté que :

- La différence du poids relatif est très significative entre le lot témoin et les lots : A et B. Cette différence est considérée comme un signe de toxicité des métaux lourds sur les poumons.
- Tous les résultats du poids absolu des poumons ne sont pas significatifs de point de vue statistique, alors aucun effet de la spiruline n'a été constaté.

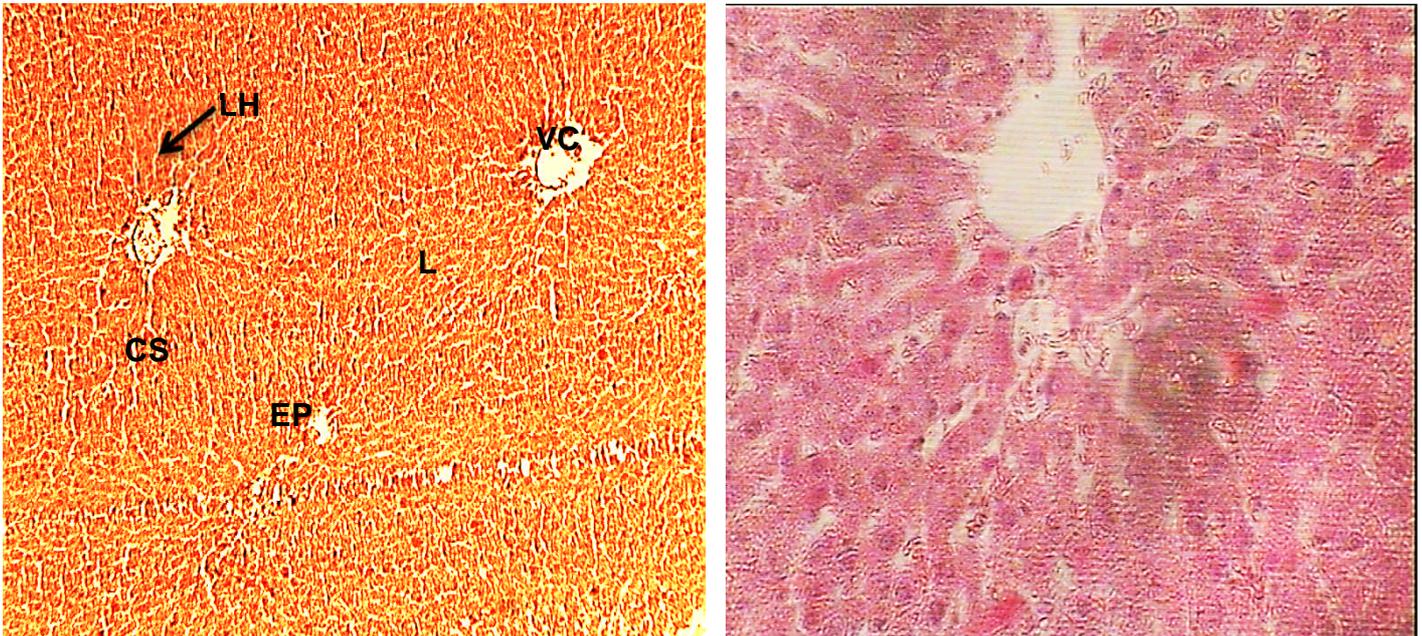
Après l'interprétation des résultats de l'examen macroscopique des organes des rats femelles adultes après les dix semaines d'expérimentation nous avons remarqué :

- Une toxicité subaiguë par voie orale des doses supplémentaires de chlorure de mercure(II), chlorure de cadmium et l'acétate de plomb(II) qui se manifeste chez les rats femelles par :

- ✓ Une altération de fonctionnement de tubes digestif qui se manifeste par un dégagement de gaz et des gonflements au niveau de l'estomac et les intestins chez 66,66 % de la population du lot traité par les métaux lourds.
  - ✓ Une diminution dans le poids absolu du foie (29,31 %), reins (17,43 %), et dans le poids relatif des reins (15,56 %) et poumons (30,76 %).
- Un effet bénéfique de la spiruline contre les effets toxiques observés chez les rats femelles par :
- ✓ Une diminution de l'altération de l'activité digestive par une absence totale des gaz et des gonflements au niveau de l'estomac et les intestins, où la spiruline semble avoir un effet protecteur sur le tube digestif.
- Aucun effet bénéfique de la spiruline n'a été constaté sur l'amélioration du poids absolu ni relatif du foie (7,39 % et 3,44 %), reins (6,55 % et 6,38 %) et poumons (2,88 % et 4,07 %).

## 2. 5.2. Résultats de l'examen microscopique des organes (coupes histologiques)

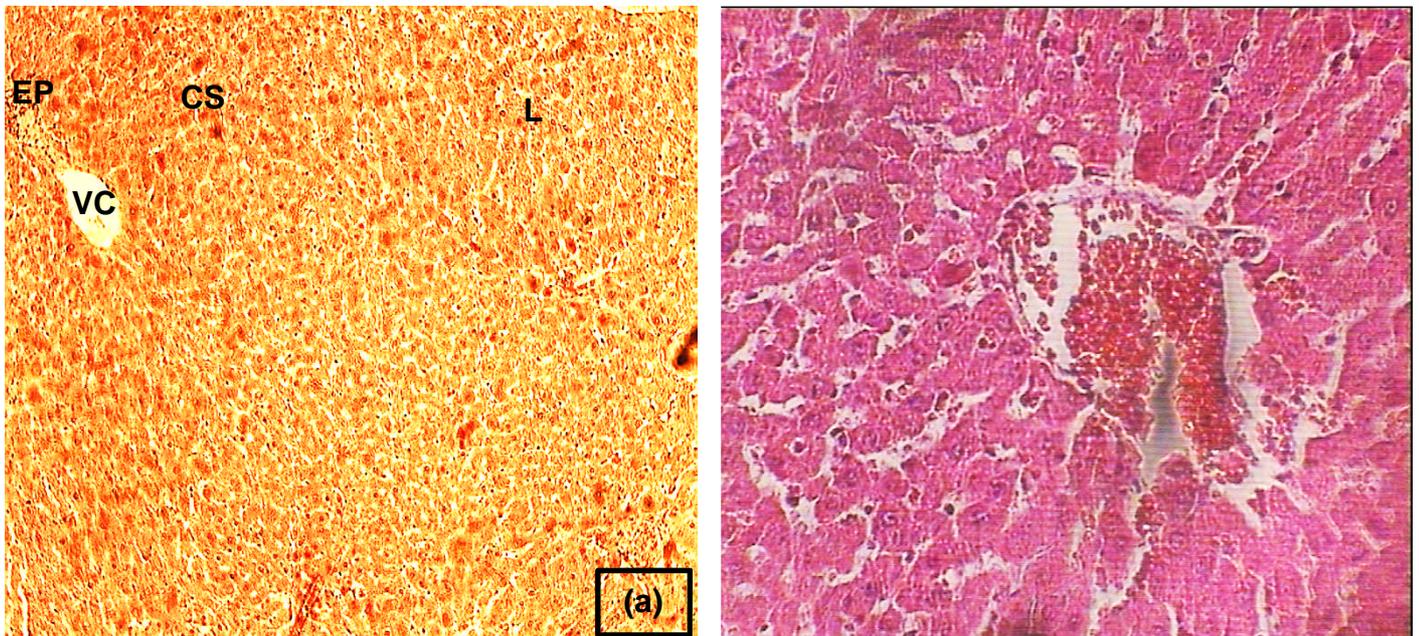
### 2. 5.2.1. Résultats des coupes histologiques du foie



**VC** : Veine Centrolobulaire ; **L** : Lobule Hépatique ; **EP** : Espace Porte ; **H** : Hépatocyte ;  
**HB** : Hépatocyte binoculaire ; **CS** : Capillaire Sinusoïde ; **LH** : Lame Hépatique (travée de  
 Remak).

Figure 5.6 : Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle témoin (photo originale).

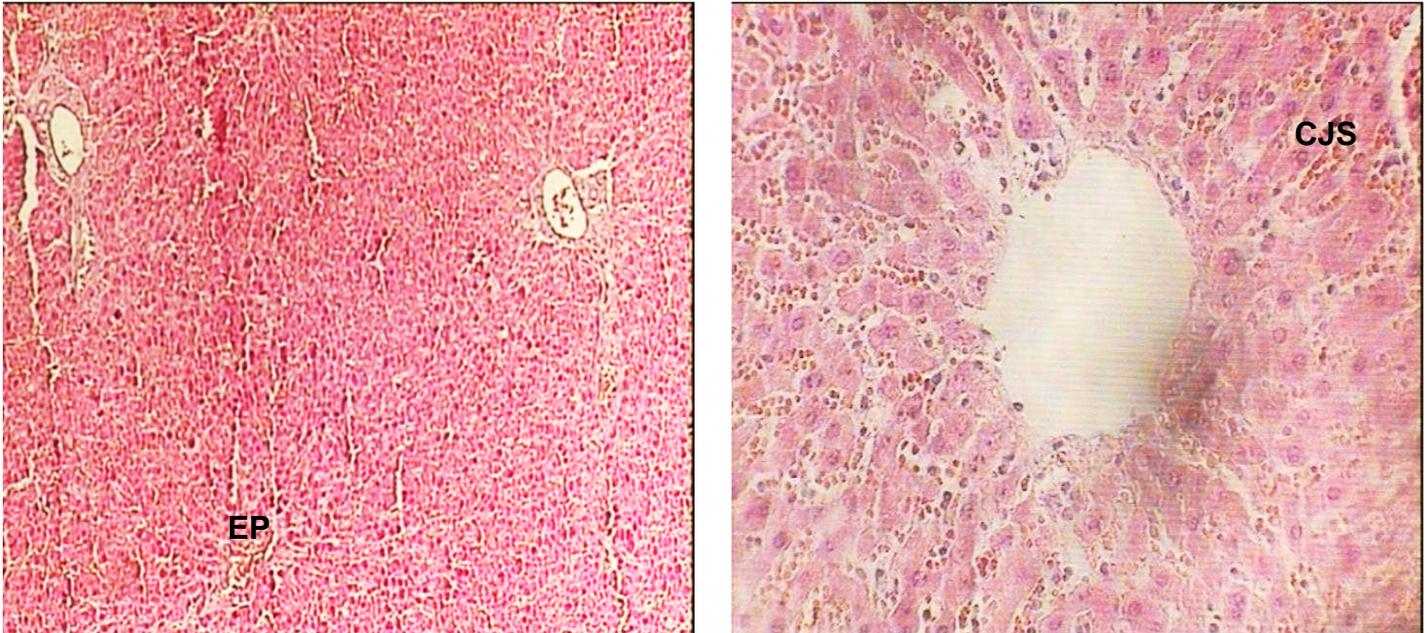
Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).



**VC** : Veine Centrolobulaire ; **L** : Lobule Hépatique ; **EP** : Espace Porte ; **H** : Hépatocyte ; **CJS** : Congestion  
 sanguine ; **HB** : Hépatocyte binoculaire ; **CS** : Capillaire Sinusoïde ; **LH** : Lame Hépatique

Figure 5.7 : Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot A (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).



**VC** : Veine Centrolobulaire ; **L** : Lobule Hépatique ; **EP** : Espace Porte ; **H** : Hépatocyte ; **CS** : Capillaire Sinusoïde ; **LH** : Lame Hépatique ; **CJS** : Congestion sanguine.

Figure 5.8 : Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot B (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).

En ce qui concerne le foie, d'après l'observation microscopique d'une coupe transversale du parenchyme hépatique d'un rat femelle témoin illustrée dans la figure 5.6, a montré un parenchyme hépatique normal constitué de plusieurs lobules hexagonaux, chaque lobule est composé de plusieurs hépatocytes polygonales à cytoplasme granuleux basophile organisées en travées de Remak toute au tour d'une veine centrolobulaire de grand diamètre, les hépatocytes petites possèdent un seul noyau alors que les plus grandes possèdent deux noyaux, les noyaux sont arrondis, présentent plus souvent deux nucléoles et une chromatine dispersée. Entre les lames hépatocytaires nous avons observé des capillaires sinusoïdes bordés par les cellules endothéliales.

Chaque lobule est limité de chaque angle par un espace porte renfermant une veine, une artère et un canal biliaire.

Dans le cas de rats traités par les métaux lourds et par rapport aux témoins, la figure 5.7 montre d'une façon globale une désorganisation architecturale du parenchyme hépatique avec une dilatation des veines centrolobulaires et dans les capillaires sinusoides, avec une congestion sanguine dans les veines centrolobulaires ces modifications sont un signe d'inflammation hépatique.

Les hépatocytes sont de taille inégale, à cytoplasme éosinophile, à noyaux unique rarement binucléaire. Quelques corps apoptotiques sont notés, ces modifications sont considérées comme des signes d'hépatotoxicité des trois métaux lourds.

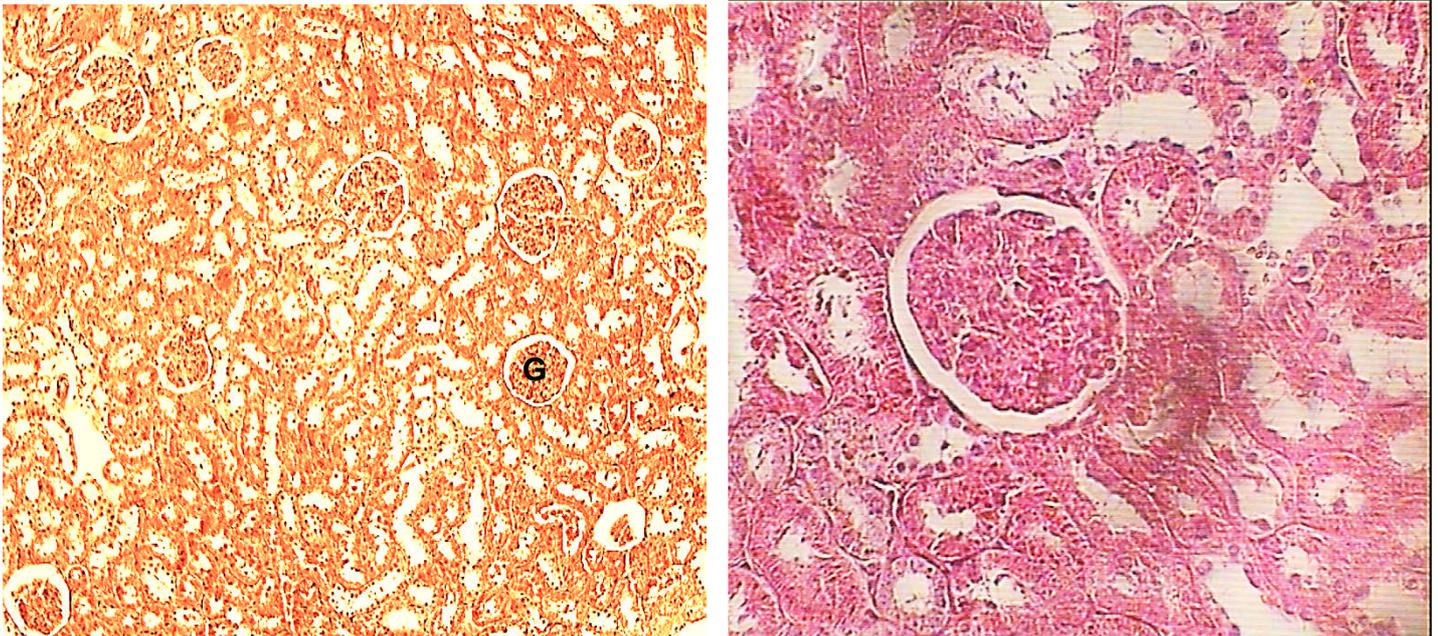
Les chercheurs expliquent le changement de taille des hépatocytes chez le rat Wistar par la conservation des fluides dans le cytoplasme ce qui entraîne une perturbation dans les échanges ioniques et provoque un stress métabolique, qui cause l'inefficacité du foie dans la biotransformation des xénobiotiques en permettant la pénétration des métabolites toxiques dans les tissus [124].

Dans le cas de rats traités par la spiruline et par rapport aux témoins et les rats du lot A, et d'après l'observation microscopique d'une coupe transversale du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot B illustrée dans la figure 5.8, nous avons remarqué une amélioration générale dans l'organisation architecturale du parenchyme hépatique avec une diminution dans la dilatation des veines centrolobulaires et les capillaires sinusoides et quelque congestions sanguine dans les capillaires sinusoides, cela est un signe de diminution de l'inflammation du parenchymes hépatique. Ces améliorations dans le parenchyme hépatique montrent l'effet protecteur de la spiruline sur le foie contre la toxicité des trois métaux lourds.

Les résultats des coupes histologiques du foie confirment les résultats des analyses biochimiques du sang des rats pour l'activité hépatique.

Nos résultats sont d'accords avec les résultats de l'étude réalisée par Yamamoto et *al.* (2006) à-propos de l'hépatoprotection de la spiruline [125].

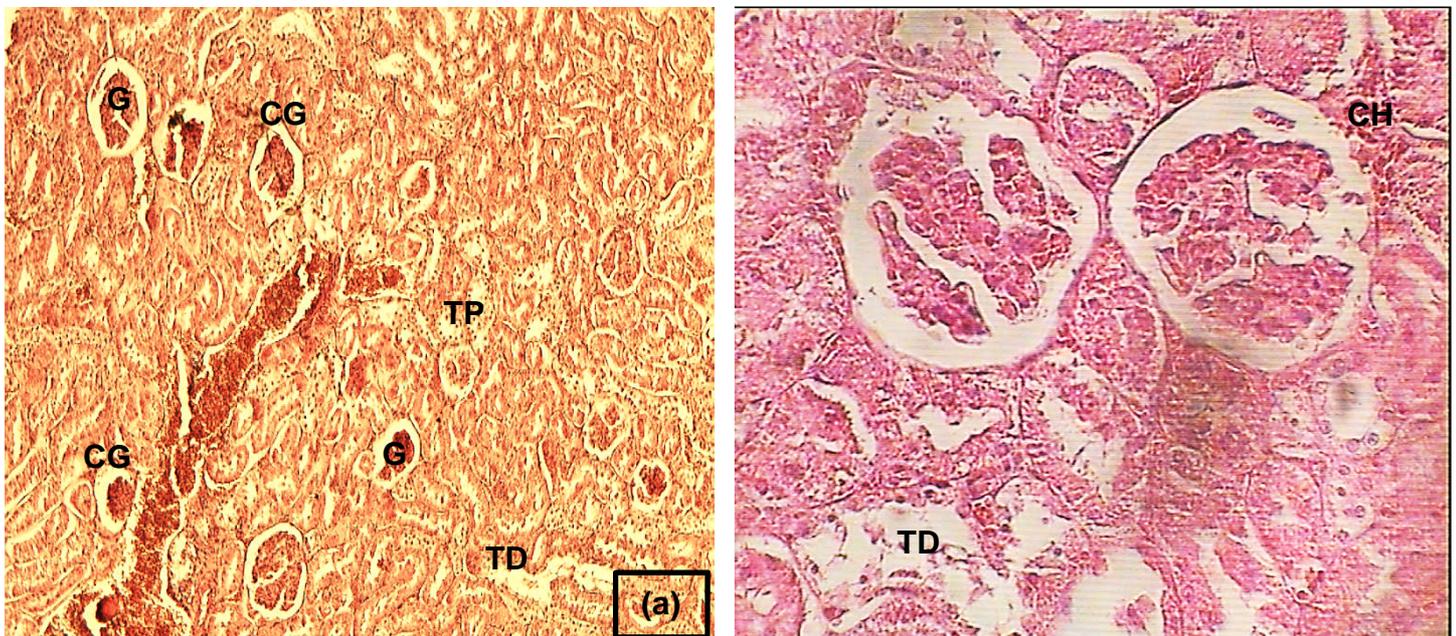
### 2.5.2.2. Résultats des coupes histologiques des reins



**G** : Glomérule rénale ; **CG** : Chambre Glomérulaire (espace de Bowman) ; **TD** : Tubes Distaux ;  
**TP** : Tubes Proximaux ; **VS** : Vaisseaux sanguins.

Figure 5.9 : Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle témoin (photo originale).

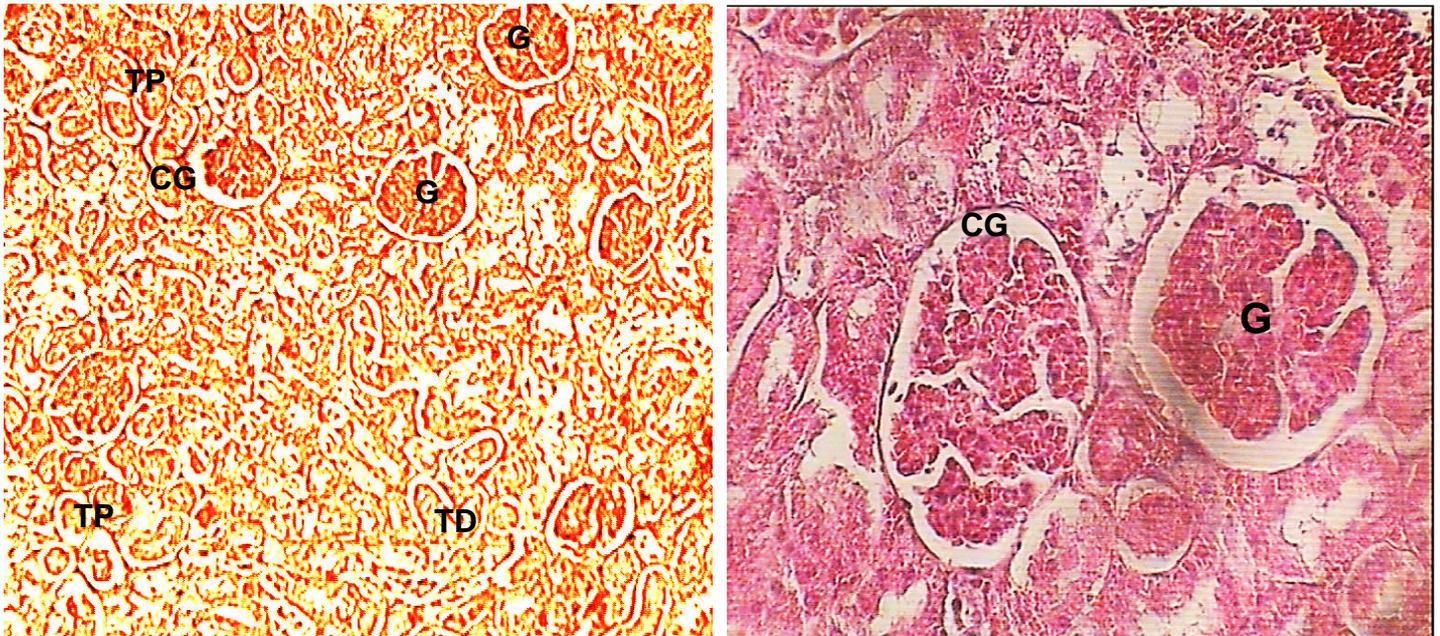
Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).



**G** : glomérule rénale ; **CG** : chambre glomérulaire (espace de Bowman) ; **TD** : Tubes Distaux ;  
**TP** : Tubes Proximaux ; **CH** : Capillaires hémorragiques.

Figure 5.10 : Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot A (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).



**G** : Glomérule rénale ; **CG** : Chambre Glomérulaire (espace de Bowman) ; **TD** : Tubes Distaux ; **TP** : Tubes Proximaux.

Figure 5.11 : Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot B (photo originale).  
Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).

En ce qui concerne les reins, l'observation microscopique d'une coupe transversale du parenchyme rénal d'un rat femelle témoin illustrée dans la figure 5.9, montre un parenchyme rénal normal constitué de l'extérieur vers l'intérieur d'une capsule rénale sous laquelle se trouve un cortex et après la médullaire. Le cortex est constitué d'un tissu de cellules aux noyaux arrondis sombres, ainsi que plusieurs glomérules rénaux de forme arrondi avec un contour irrégulier, constitués de cellules mésangiales à noyaux sombres entouré d'une chambre glomérulaire (espace de Bowman). Les glomérules sont entourés par des tubes contournés proximaux et des tubes distaux.

Dans la médulla de nombreux tubes collecteurs de forme allongée entourés par des cellules allongées sombres et des vaisseaux sanguins sont présents.

D'après l'illustration de la figure 5.10, l'observation microscopique d'une coupe transversale du parenchyme rénal de rat femelle du lot A nous avons remarqué que le traitement par les trois métaux lourds provoque une dénaturation et des cellules mésangiales des glomérules et la dilatation des capillaires des

glomérules, des capillaires hémorragiques sont observés, avec une dilatation de l'espace glomérulaire.

Les tubes rénaux sont tantôt collabés, et tapissés d'une couche de cellules cylindriques bombant dans la lumière, l'interstitium est légèrement inflammatoire.

Les modifications observées au niveau du parenchyme rénal constituent des signes de l'inflammation rénale et la néphrotoxicité sous l'effet des trois métaux lourds, cette dernière confirme les résultats des analyses de détermination de l'activité rénale dans la partie analyse biochimique du sang.

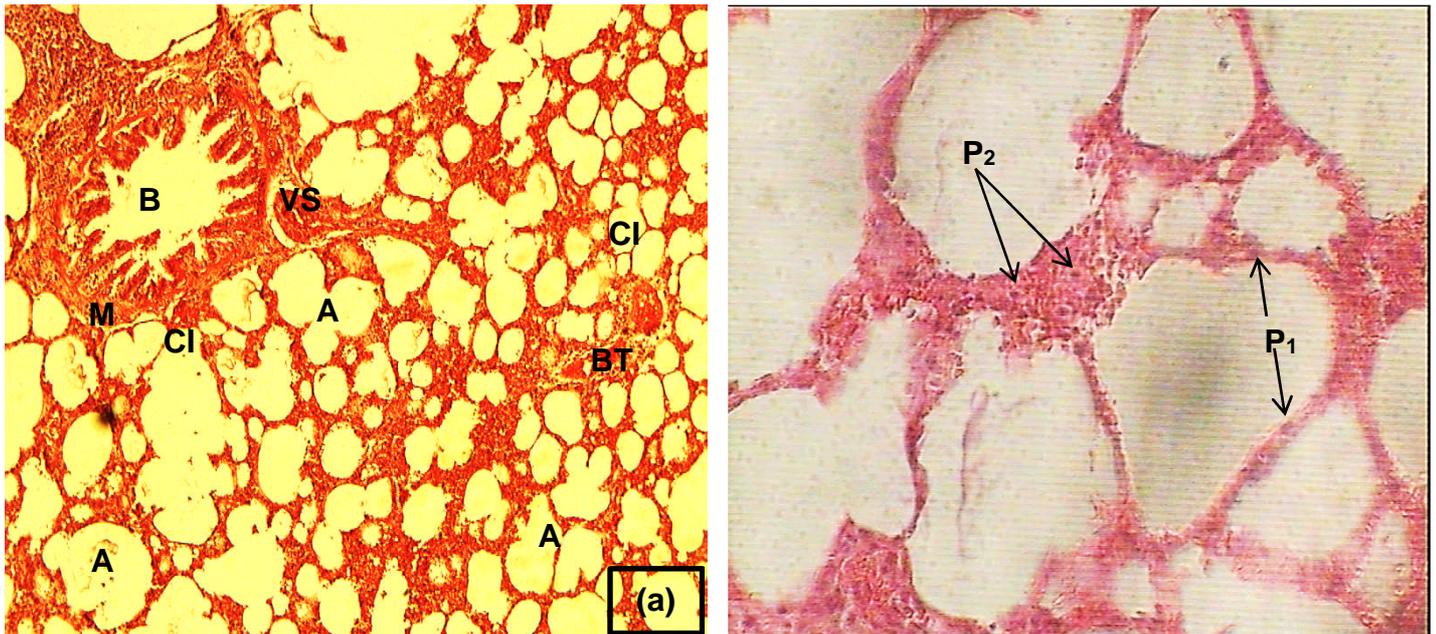
Dans le cas des rats traités par la spiruline et par rapport aux témoins et les rats du lot A, et d'après l'observation microscopique d'une coupe transversale du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot B illustrée dans la figure 5.11, montre une amélioration générale dans l'organisation architecturale du parenchyme rénal surtout la préservation de la structure des glomérules et la chambre glomérulaire, avec une diminution dans la dénaturation des cellules mésangiales des glomérules et diminution de la dilatation des capillaires glomérulaires et la chambre glomérulaire .

Les tubes rénaux : proximaux et distaux ne sont pas vraiment préservés par la spiruline.

Ces améliorations dans le parenchyme rénal montrent l'effet protecteur de la spiruline sur les reins surtout la protection des glomérules rénaux contre la toxicité des trois métaux lourds.

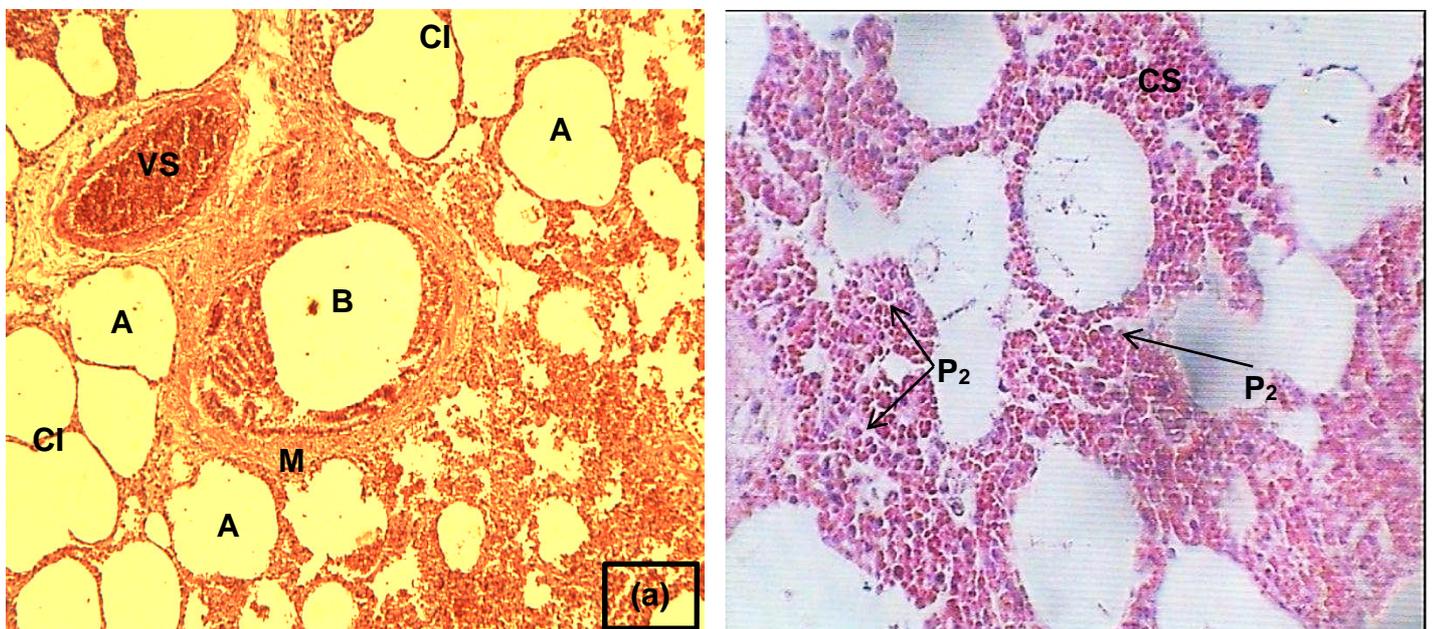
Nos résultats sont en accord avec les résultats de l'étude japonaise de Hideki, F., et al (2011) où la spiruline permet de diminuer le dysfonctionnement rénal causé par le chlorure mercurique.

### 2. 5.2.3. Résultats des coupes histologiques des poumons



**A** : Alvéole ; **B** : Bronchiole ; **BT** : Bronchiole terminale ; **M** : Muscle lisse ;  
**VS** : Vaisseaux sanguins ; **CI** : Cloison interalvéolaire ; **P<sub>1</sub>** : Pneumocyte I ; **P<sub>2</sub>** : Pneumocyte II.  
 Figure 5.12 : Histologie du parenchyme pulmonaire d'un rat femelle témoin (photo originale).

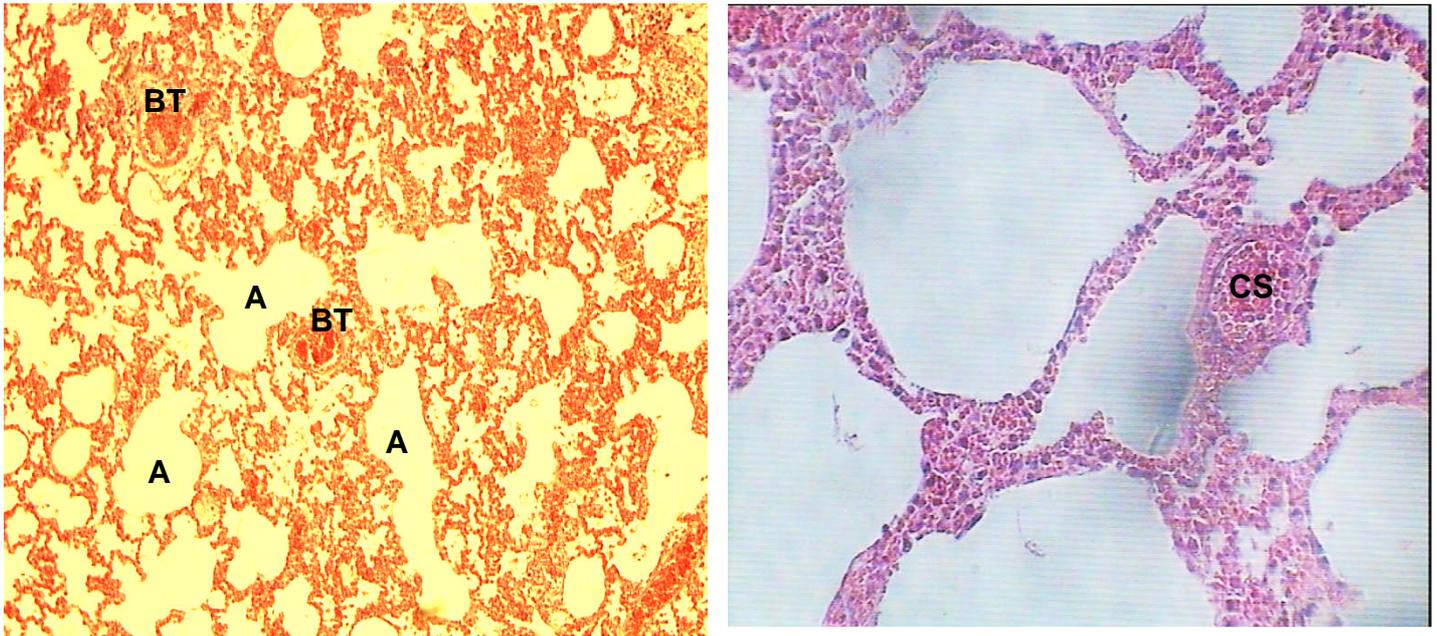
Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).



**A** : Alvéole ; **B** : Bronchiole ; **BT** : Bronchiole terminale ; **M** : Muscle lisse ; **VS** : Vaisseaux sanguins ; **CI** : Cloison interalvéolaire ; **P<sub>1</sub>** : Pneumocyte I ; **P<sub>2</sub>** : Pneumocyte II ; **CS** : Congestion sanguine.

Figure 5.13 : Histologie du parenchyme pulmonaire d'un rat femelle du lot A (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b)



**A** : Alvéole ; **BT** : Bronchiole terminale ; **VS** : Vaisseaux sanguins ; **CI** : Cloison interalvéolaire ;  
**P<sub>1</sub>** : Pneumocyte I ; **P<sub>2</sub>** : Pneumocyte II **CS** : Congestion sanguine.

Figure 5.14 : Histologie du parenchyme pulmonaire d'un rat femelle du lot B (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).

Dans le cas des poumons, et d'après l'illustration de la figure 5.12, l'observation microscopique d'une coupe transversale du parenchyme pulmonaire de rat femelle témoin montre la présence des bronchioles constituées du centre à la périphérie d'une lumière plus au moins large bordée par un épithélium cylindrique cilié avec des noyaux plus au moins allongés. L'épithélium est disposé sur un tissu conjonctif lâche fin, entouré par une couche musculaire lisse peu épaisse. Des bronchioles terminales de petits diamètres dont la lumière est bordée d'un épithélium cubique simple ont été observées.

Le parenchyme pulmonaire est normal contenant de très nombreux alvéoles, petits espaces séparés les uns des autres par des cloisons interalvéolaires qui contiennent des cellules aplaties. Chaque alvéole possède des petites cellules musculaires lisses qui contrôlent son ouverture et entouré par un épithélium très aplatis, celui-ci comprend deux types de cellules : le parenchyme de type I, cellules pavimenteuses avec des noyaux aplatis et le parenchyme de type II qui possède des noyaux volumineux arrondis.

D'après l'illustration de la figure 5.13, l'observation microscopique d'une coupe transversale du parenchyme pulmonaire de rat femelle du lot A montre que les tailles des alvéoles des rats traités par les trois métaux lourds sont plus importantes en comparés à celle de témoin, cela est expliqué par une dilatation des alvéoles sous l'effet des métaux lourds et c'est un signe d'inflammation. Noton également un épaissement des parois alvéolaires, expliqué par une prolifération cellulaire très importante en particulier les pneumocytes de type II capable de synthétiser des cytokines qui leur confèrent un rôle important dans le processus inflammatoire pulmonaire [126], associée à une alvéolite chronique et une congestion sanguine avec des vaisseaux dilatés.

Le chlorure de mercure(II), chlorure de cadmium et l'acétate de plomb(II) sont considérés comme toxines pulmonaires qui provoquent des dommages graves sur les poumons, surtout le chlorure de cadmium qui provoque des irritations pour les membranes muqueuses et les voies respiratoires, irritation sévère des poumons, bronchite, emphysème, pneumonite chimique, œdème pulmonaire [107, 108 et 109].

D'après l'illustration de la figure 5.14, l'observation microscopique d'une coupe transversale du parenchyme pulmonaire de rat femelle du lot B, et on comparant avec celui de témoin et le lot A, le traitement avec la spiruline ne corrige pas beaucoup les dégâts causés par les trois métaux lourds à l'exception d'une petite diminution de la prolifération cellulaire dans les parois alvéolaires.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Du fait de l'industrialisation galopante, l'homme est très exposé et cela par différentes voies à plusieurs types d'agents toxiques. Parmi les agents hautement toxiques pour l'homme et les animaux, les métaux lourds tels que le mercure, le cadmium et le plomb sont très nocifs.

Une solution s'ouvre pour l'homme afin de préserver sa santé, c'est la protection contre la toxicité de ces agents en revenant à la nature et à sa richesse en substances bioactives cachées à l'intérieur de plusieurs organismes vivants.

A cet effet, la spiruline est une cyanobactérie primitive faisant l'objet de plusieurs recherches dans le domaine de la nutrition et la santé.

Notre étude a visé la recherche des effets bénéfiques de la spiruline (*spirulina platensis*) contre la toxicité subaiguë par voie orale de trois métaux lourds sous forme de : chlorure de mercure(II), chlorure de cadmium et l'acétate de plomb(II) pendant dix semaines d'expérimentation sur des rats femelles adultes de la souche Wistar. Les résultats de cette étude nous ont conduit à conclure :

Une toxicité subaiguë par la voie orale des doses supplémentaires de chlorure de mercure(II), chlorure de cadmium et l'acétate de plomb(II) qui s'est manifesté chez les rats femelles adultes par :

- ✓ Perturbation de comportement avec un stress, une excitation, une déshydratation, constipation et faiblesse chez tous les rats traités.
- ✓ Une grande diminution du poids corporel allant jusqu'à 31,15 %.
- ✓ Perte d'appétit qui se traduit par une grande diminution de la quantité d'aliment ingérée par les rats allant jusqu'à 30,94 %.
- ✓ Une grande diminution de la fertilité chez les femelles par un taux de 83,34%, en traversant la barrière de placenta avec une foetotoxique grave.

- ✓ Installation d'insuffisance rénale transitoire qui est un signe de la néphrotoxicité avec une augmentation dans la créatinémie (30,85 %) l'urémie (34,14 %) et l'uricémie (47,81 %).
- ✓ Inflammation du parenchyme rénal et néphrotoxicité, qui se manifeste par une dénaturation des cellules mésangiales des glomérules, la dilatation des capillaires des glomérules et de la chambre glomérulaire, ainsi des capillaires hémorragiques sont observés. Avec une altération et inflammation des tubes rénaux.
- ✓ Altération de l'activité hépatique avec une augmentation de taux sérique du cholestérol total (28,91 %) et les triglycérides sériques (22,36 %).
- ✓ Inflammation hépatique avec une désorganisation architecturale du parenchyme hépatique et dilatation des veines centrolobulaires et des capillaires sinusoides et congestion sanguine. Les hépatocytes sont de taille inégale, à cytoplasme éosinophile, à noyaux unique rarement binucléaire, quelques corps apoptotiques sont notés.
- ✓ Anémie microcytaire hypochrome avec une diminution du nombre des érythrocytes (39,98 %), d'hémoglobine (24,54 %), et d'hématocrite (28,40 %).
- ✓ Augmentation du nombre des leucocytes (7,47 %) suite à une réponse immunitaire contre la toxicité des métaux lourds.
- ✓ Augmentation de nombre des plaquettes sanguines (18,33 %).
- ✓ Altération de fonctionnement de tube digestif qui se manifeste par un dégagement de gaz et gonflement au niveau de l'estomac et les intestins chez 66,66 % de population des rats traités par les métaux lourds .
- ✓ Diminution du poids absolu du foie (29,31 %), reins (17,43 %), et dans le poids relatif des reins (15,56 %) et poumons (30,76 %).
- ✓ Inflammation pulmonaire avec une dilatation des alvéoles et un épaissement des parois alvéolaires, expliqué par une prolifération cellulaire très importante en particulier les pneumocytes de type II, avec une congestion sanguine.

Des effets bénéfiques sembleraient produire par la spiruline contre les effets toxiques des trois métaux lourds observés chez les rats femelles par :

- ✓ Diminution de la perturbation de comportement, la spiruline semble avoir un effet calmant très apparent sur les rats.

- ✓ Augmentation du poids corporel des rats traités par la spiruline peut aller jusqu'à 10,81 %, avec une grande capacité de récupération et prise de poids en absence des doses de métaux lourds.
- ✓ Stimulation de l'appétit, qui se traduit par une augmentation de la quantité d'aliment ingérée par les rats allant jusqu'à 23,83%.
- ✓ Augmentation de la fertilité par un taux de 33,34 %, avec une protection des fœtus contre la toxicité orale de mercure, cadmium et plomb.
- ✓ Diminution de l'altération de l'activité rénale et néphrotoxicité, avec une diminution dans la créatinémie (23,96 %), l'urémie (23,17 %) et l'uricémie (27,72 %), la spiruline a un effet protecteur sur les reins et l'activité rénale.
- ✓ Effet protecteur de la spiruline sur les reins surtout la protection des glomérules rénaux avec une amélioration générale dans l'organisation architecturale du parenchyme rénal, et une diminution de la dénaturation et des cellules mésangiales des glomérules et diminution de la dilatation des capillaires et la chambre glomérulaire.
- ✓ Diminution de la perturbation de l'activité hépatique avec une diminution de taux sérique du cholestérol total (16,90 %) et les triglycérides sériques (3,27 %).
- ✓ Effet protecteur de la spiruline sur le foie, avec une amélioration générale dans l'organisation architecturale du parenchyme hépatique et une diminution dans la dilatation des veines centrolobulaires et les capillaires sinusoides et de la congestion sanguine cela est un signe de diminution de l'inflammation du parenchyme hépatique.
- ✓ Diminution de l'anémie érythrocytaire avec une augmentation du nombre des érythrocytes (28,16 %), d'hémoglobine (18,76 %), et d'hématocrite (22,05 %).
- ✓ Stimulation du système immunitaire avec une augmentation du nombre des leucocytes (12,05 %) à savoir les lymphocytes, monocytes et granulocytes.
- ✓ Diminution de l'altération de l'activité digestive par une absence totale des gaz et des gonflements au niveau de l'estomac et les intestins, où la spiruline semble avoir un effet protecteur sur tube digestif.
- ✓ Le traitement par la spiruline ne corrige pas beaucoup les dégâts causés par les 3 métaux lourds sur les poumons à l'exception d'une petite diminution de la prolifération cellulaire dans les parois alvéolaires.

D'après nos résultats nous avons également conclu que :

- ✓ La spiruline n'a pas d'effet sur l'amélioration du poids absolu ni sur le poids relatif du foie (7,39 % et 3,44 %), des reins (6,55 % et 6,38 %) et des poumons (2,88 % et 4,07 %).
- ✓ Les tubes rénaux : proximaux et distaux ne sont pas vraiment préservés par la spiruline.
- ✓ La spiruline n'a pas d'effet sur les plaquettes sanguines (différence négligeable 0,22 %).

Des études complémentaires approfondies nous paraissent être nécessaires afin d'approfondir certains aspects non développés dans notre étude tel que la :

- Réalisation d'autres études expérimentales sur des rats Wistar mâles.
- Réalisation d'autres études sur d'autre espèce animale comme les lapins.
- Augmentation de la quantité de la spiruline utilisée pour l'enrichissement de l'aliment des rats jusqu'à 5 %.
- Utilisation d'extraits de différents constituants de la spiruline : phycocyanine, polysaccharides, lipides, protéines.....ect, pour bien sélectionner l'élément actif.
- Tester l'effet de la spiruline sur d'autres métaux lourds toxiques tel que : le Chrome (Cr), le Nickel (Ni), l'Arsenic (As) et l'Etain (Sn).
- Réalisation d'études sur l'effet calmant de la spiruline déjà observé dans notre étude par des essais comportementaux et neurologiques.
- Réalisation de recherches à-propos de l'effet protecteur de la spiruline sur le tube digestif déjà cité dans notre étude par des essais microbiologiques, et des coupes histologiques sur l'estomac et les intestins.

## APPENDICES

### APPENDICE A

#### REACTIFS DES ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES DE L'EAU

##### 1- Réactifs du pH-mètre

- Solution tampon pH=10 et pH =4.
- Solution H<sub>2</sub>So<sub>4</sub> à 0,01N.

##### 2- Réactifs de dosage de Ca et Mg

###### ➤ Solution E.D.T.A

- 40 g E.D.T.A
- 5 g Soude caustique
- 1 g Chlorure de Magnésium.

Dissoudre 40 g E.D.T.A, ajouter les 5 g NaOH puis ajuster avec de l'eau distillée 1000 ml.

Dissoudre à part 1 g de chlorure de magnésium, ajuster avec de l'eau distillée 1000 mL.

Mélanger les 2 Litres ainsi obtenus et y ajouter 8 autres litres d'eau distillée ce qui donne 10 litres d'E.D.T.A.

###### ➤ Solution Tampon pH=10 (Ca/Mg)

Le Tampon pH=10 est constitué par des mélanges à volume égale des solutions A et B.

###### ▪ Solution A

Peser 67 g de Chlorure d'ammonium préalablement séché 12 heures à l'étuve à 100°C puis refroidi au dessiccateur.

Ajouter 400 ml d'Ammoniaque à 28% (448 mL à 25%)

Compléter à 1000 ml par de l'eau distillée.

###### ▪ Solution B

Dissoudre à 2 litres d'eau distillée 1,5 Kg environ de Tartrate double de Sodium et de Potassium appelé couramment sel de seignette. Chauffer jusqu'à dissolution totale et ajuster à 2 litre.

➤ Solution de soude

40 g de Soude par litre d'eau distillée.

➤ Indication colore : Poudre colorée

3- Réactifs de dosage de chlorure

➤ Solution Saturée de Thiocyanate Mercurique

Dissoudre 2g Hg (SCN)<sub>2</sub> dans 2 litres d'eau bidistillée.

➤ Solution d'alun ferrique

67 g d'Alun ferrique Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>24H<sub>2</sub>O

430mL d'acide nitrique concentré

L'eau distillée Q.S.P 1000 mL.

➤ Solution mère de chlorures à 10 g/l

Dissoudre 20,984g de Chlorure de potassium pur préalablement desséché 12 heures à l'étuve à 100°C dans de l'eau distillée, ajuster à 1000 mL.

➤ Solutions étalons

Prendre successivement :

100, 80, 65, 50, 35, 20, 10 et 5 mL de la solution mère de Cl<sup>-</sup> compléter chaque prélèvement à 1000 mL exactement par de l'eau distillée. On obtient alors des solutions étalons contenant respectivement :

1000, 800, 650, 500, 350, 200, 100 et 50 mg/L en chlorures. Les stocker dans des flacons étiquetés.

4- Réactifs de dosage de Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>

➤ Solution mère de sodium et de potassium

Dissoudre dans de l'eau distillée 25,434 g de chlorure de sodium préalablement séché à l'étuve à 100°C pendant 12 heures puis refroidi au dessiccateur.

Dissoudre simultanément 3,823 g de chlorure de potassium préalablement séché à l'étuve à 100°C pendant 12 heures puis refroidi au dessiccateur.

Compléter le tout à 1000 mL par de l'eau distillée.

On obtient une solution contenant 10 000 mg/L en  $\text{Na}^+$  et 2000 mg/l en  $\text{K}^+$ .

➤ Solutions étalons en  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$

Mettre successivement dans des fioles jaugées à 1000 mL:

50, 40, 30, 20, 15, 10, 5 et 2 mL de la solution mère en  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  compléter à 1000ml par de l'eau distillée.

On obtient des solutions étalons contenant respectivement:

500, 400, 300, 150, 100, 50 et 20 mg/L de  $\text{Na}^+$ .

100, 80, 60, 40, 30, 20, 10 et 4mg/L de  $\text{K}^+$ .

- Sulfate de Lithium : dissoudre 23.042 g de Lithium sulfate dans 250 mL d'eau distillée.
- Bridj 35 (solution à préparée).
- Eau distillée q.s.p. 100 mL.

## APPENDICE B

### REACTIFS DES ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES DE L'ALIMENT DES RATS

#### 1- Réactifs de dosage des protéines

1 à 2 g de catalyseur.

12,5 mL d'acide sulfurique concentré.

100 mL d'eau distillée.

50 mL de solution NaOH (soude à 47%).

Solution de soude (333 g de NaOH dans 1L d'eau distillée).

20 mL de la solution absorbante (solution d'acide borique et l'indicateur : rouge de méthyle+ vert de bromocrésol).

1 à 2 g de catalyseur.

Acide sulfurique à 0,1 N.

#### 2- Réactifs de dosage de la matière grasse

150 mL d'éther.

Eau distillée.

#### 3- Réactifs de dosage du calcium

40 mL d'acide chlorhydrique.

60 mL d'eau distillée.

Quelques gouttes d'acide nitrique.

20 à 40 mg de solution mère calcium.

1 mL d'acide citrique.

5 mL de solution chlorure d'ammonium.

100 mL l'eau distillé.

Quelques gouttes de solution de vert de bromocrésol.

30 mL de solution d'oxalate d'ammonium chaude.

50 mL d' H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> chaude.

Le permanganate de potassium (0,1N).

#### 4- Réactifs de dosage du phosphore

20 mL d'acide sulfurique.

2 mL d'acide nitrique.

1 g de carbonate de calcium.

10 mL d'acide chlorhydrique.

10 mL du réactif vanado-molybdique.

## APPENDICE C

### REACTIFS DES ANALYSES BIOCHIMIQUES DU SANG

#### 1- Réactifs de dosage de l'Urée

- Le réactif A1 :
  - Salicylates sodique (62 mmol/L).
  - Nitroprussiate sodique (3,4 mmol/L).
  - Tampon phosphate pH=6,9 (20 mmol/L).
- Le réactif A2 :
  - Uréase (>500 mmol/L).
  - Hypochloride sodique (7 mmol/L).
  - Hydroxyde de sodium (150 mmol/L).
- L'étalon d'urée (0,5 g/L)

#### 2- Réactifs de dosage de la Créatinine

Le réactif A1 : Solution picrate (17,5 mmol/L)

Le réactif A2 : Hydroxyde de sodium (0,29 mmol/L).

L'étalon de la créatinine (2 mg/L).

#### 3- Réactifs de dosage de l'Acide urique

- Le réactif 1 (tampon) :
  - Phosphate pH=7,4 (50 mmol/L).
  - 2-4 dichlorophénol sulfonate DCPS (4 mmol/L).
  - Tampon phosphate pH=6,9 (20 mmol/L).
- Le réactif 2 (enzymes) :
  - Uricase (60, 600 U/L).
  - Ascorbate oxydase (200 U/L).
  - 4-6 Aminophénazone 4-AP (150 mmol/L).
- L'étalon de l'acide urique (60 mg/L).

#### 4- Réactifs de dosage du Cholestérol total

- Réactif de travail :
  - Pipes (35 mmol/L).
  - Cholate de sodium (0,5 mmol/L).
  - Phénol (28 mmol/L).
  - Cholestérol estérase (>0,2 mmol/L).
  - Cholestérol oxydase (>0,1 mmol/L).
  - Peroxydase (0,8 mmol/L).
  - 4-aminoantipyrine (0,8 mmol/L).
- L'étalon du cholestérol (200 mg/l).

#### 5- Réactifs de dosage des triglycérides

- Le réactif 1 (tampon) :
  - Pipes Puffer pH=7,2 (50 mmol/L).
  - p-chlorophénol (2 mmol/L).
- Le réactif 2 (enzymes) :
  - Lipoprotéine lipase (150000 U/L).
  - Glycérol kinase GK (800 U/L).
  - Glycérol-3-P-oxydase (4000 U/L).
  - Peroxydase (440 U/L).
  - Amino-4-antipyrine (0,7 mmol/L).
  - ATP (0,3 mmol/L).
- L'étalon de triglycérides (2,28 mmol/L).

## APPENDICE D

### REACTIFS DE L'ETUDE HISTOPATHOLOGIQUE

➤ Réactifs utilisés pour les coupes histologiques

Le formol à 10%

L'alcool éthylique à concentration :

- Alcool 50°.
- Alcool 70°.
- Alcool 95°.
- Alcool 100°.

Le xylène.

L'hématoxyline.

L'Éosine.

L'huile à émersion

La paraffine pure.

## APPENDICE E

### VERRERIE ET OUTILS UTILISES DANS LE TRAVAIL

- Bouteilles en plastique PET.
- Les béchers: 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml.
- Les fioles: 100 ml, 250 ml, 500 ml.
- Des erlens.
- Ballons en verre.
- Eprouvettes gradues: 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 1000 ml.
- Nacelles métalliques menues de couvercle.
- Creusets en céramiques.
- Le creuset filtrant porosité 4.
- Les matras de KJELDAHL en verre.
- Entonnoir verre et en plastique.
- Piécette d'eau distillée.
- Pipettes gradués: 5 ml, 10 ml, 20 ml, 25 ml.
- Burette gradue en verre.
- Cartouche à extraction de matière grasse.
- Dispositif de filtration sous vide.
- Fiole conique a filtré.
- Tubes à essais en verre.
- Les tubes de prélèvement sanguin en plastique (hépariné et EDTA).
- Les micropipettes : 1 ml, 2 ml, 5 ml.
- Portoirs des tubes.
- Les lames et les lamelles en verre.
- Les lames de dissection stériles.
- Les peaux de prélèvement d'organes.
- Les cassettes en plastiques pour les bloque des coupe histologiques.

## APPENDICE F

### LES RATS MALES UTILISES POUR L'ACCOUPLEMENT DES FEMELLES

➤ Les rats males de l'accouplement

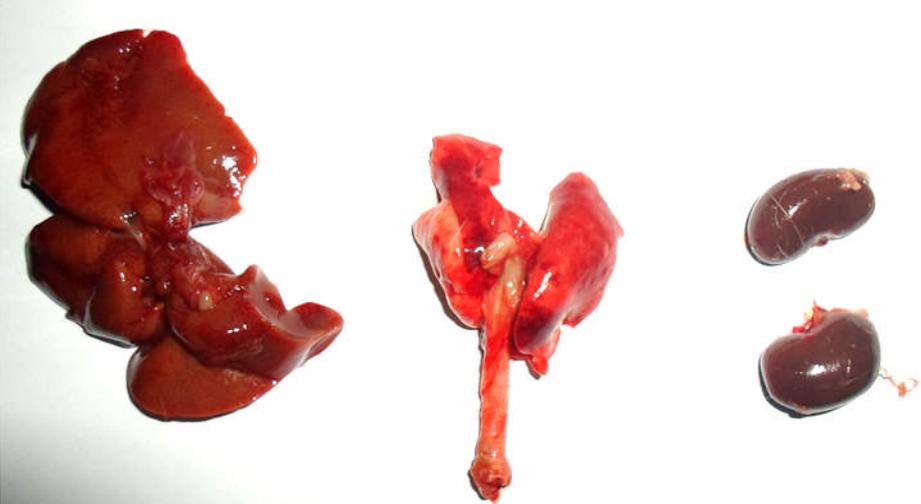
	Poids corporelle	Accouplement des femelles
1	335 g	Sans spiruline
2	316 g	Avec spiruline
3	307 g	Témoins
4	307 g	Témoins

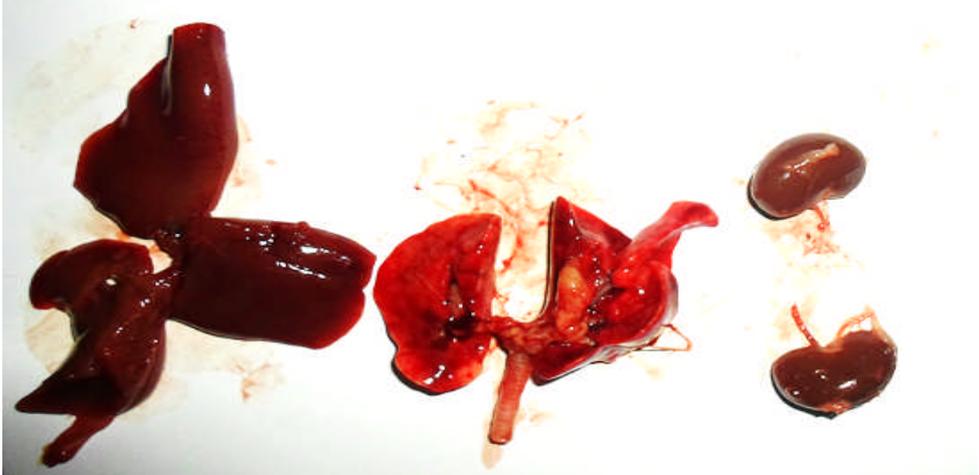


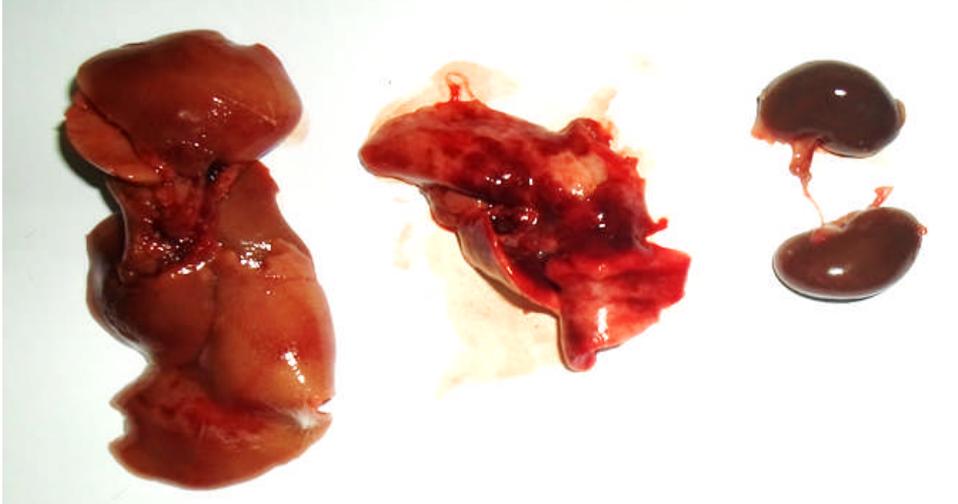
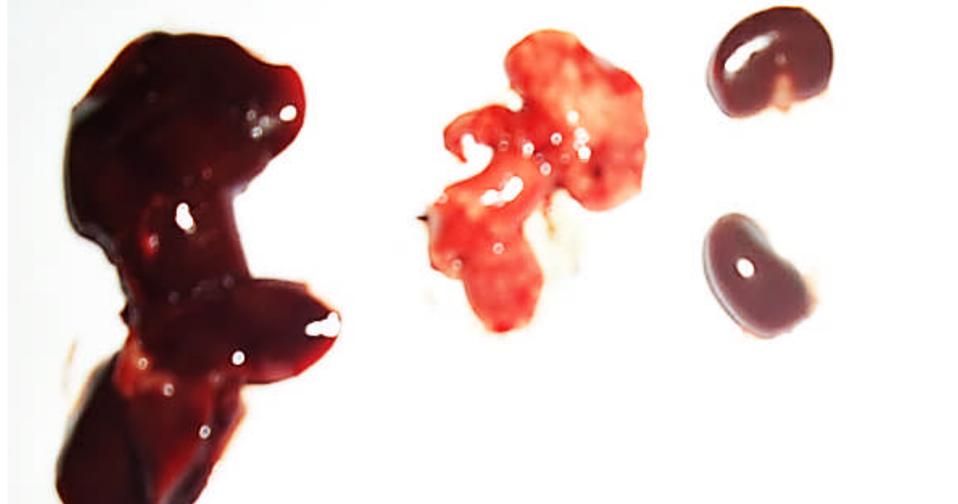
Les rats males destiné à l'accouplement

**APPENDICE G****LES ORGANES (FOIE, POUMONS ET RIENS) DES RATS**

N°	1- Les organes (foie, poumons et reins) des rats du lot Témoin
1	 A photograph showing three sets of rat organs on a white surface. On the left is a large, dark brown, lobulated liver. In the center is a pair of reddish, lobulated lungs. On the right are two dark brown, bean-shaped kidneys. There are some light-colored stains on the surface around the organs.
2	 A photograph showing three sets of rat organs on a white surface. On the left is a large, dark brown, lobulated liver. In the center is a pair of reddish, lobulated lungs. On the right are two dark brown, bean-shaped kidneys. There are some light-colored stains on the surface around the organs.
3	 A photograph showing three sets of rat organs on a white surface. On the left is a large, dark brown, lobulated liver. In the center is a pair of reddish, lobulated lungs. On the right are two dark brown, bean-shaped kidneys. There are some light-colored stains on the surface around the organs.

N°	2- Les organes (foie, poumons et reins) des rats du lot A
1	 This photograph shows three sets of rat organs. On the left is a large, dark reddish-brown liver with a lobulated surface. In the center is a pair of lungs, appearing as bright red, spongy structures. On the right are two dark, bean-shaped kidneys, one positioned above the other.
2	 This photograph shows three sets of rat organs. On the left is a large, dark reddish-brown liver with a lobulated surface. In the center is a pair of lungs, appearing as bright red, spongy structures. On the right are two dark, bean-shaped kidneys, one positioned above the other.
3	 This photograph shows three sets of rat organs. On the left is a large, dark reddish-brown liver with a lobulated surface. In the center is a pair of lungs, appearing as bright red, spongy structures. On the right are two dark, bean-shaped kidneys, one positioned above the other.

N°	2- Les organes (foie, poumons et reins) des rats du lot A.
4	 Photograph 4 shows three sets of rat organs. On the left is a pair of dark red, lobulated livers. In the center is a pair of lungs, appearing as reddish, spongy structures. On the right is a pair of dark red, bean-shaped kidneys.
5	 Photograph 5 shows three sets of rat organs. On the left is a pair of dark red, lobulated livers. In the center is a pair of lungs, appearing as reddish, spongy structures. On the right is a pair of dark red, bean-shaped kidneys.
6	 Photograph 6 shows three sets of rat organs. On the left is a pair of dark red, lobulated livers. In the center is a pair of lungs, appearing as reddish, spongy structures. On the right is a pair of dark red, bean-shaped kidneys.

N°	3- Les organes (foie, poumons et reins) des rats du lot B.
1	 A photograph showing three sets of rat organs. On the left is a large, dark brown, lobulated liver. In the middle is a pair of reddish, lobulated lungs. On the right is a pair of dark, bean-shaped kidneys.
2	 A photograph showing three sets of rat organs. On the left is a large, reddish-brown, lobulated liver. In the middle is a pair of reddish, lobulated lungs. On the right is a pair of dark, bean-shaped kidneys.
3	 A photograph showing three sets of rat organs. On the left is a large, dark brown, lobulated liver. In the middle is a pair of reddish, lobulated lungs. On the right is a pair of dark, bean-shaped kidneys.

N°	3- Les organes (foie, poumons et reins) des rats du lot B.
4	 Photograph 4 shows three sets of rat organs. On the left is a large, dark reddish-brown liver with a lobulated surface. In the center is a pair of lungs, appearing as bright red, spongy structures. On the right are two dark, bean-shaped kidneys, one positioned above the other.
5	 Photograph 5 shows three sets of rat organs. On the left is a large, dark reddish-brown liver with a lobulated surface. In the center is a pair of lungs, appearing as bright red, spongy structures. On the right are two dark, bean-shaped kidneys, one positioned above the other. A small portion of the number '5' is visible in the bottom right corner of the image.
6	 Photograph 6 shows three sets of rat organs. On the left is a large, dark reddish-brown liver with a lobulated surface. In the center is a pair of lungs, appearing as bright red, spongy structures. On the right are two dark, bean-shaped kidneys, one positioned above the other.

## LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

**AAP** : Amino-4-Antipyrine.

**AFNOR** : Association Française de Normalisation.

**AFSSA** : Agence française de sécurité sanitaire et alimentaire.

**AGPI** : Acides Gras Polyinsaturés.

**ANC** : Apports nutritionnels conseillés.

**BPL** : Bonne Pratique de Laboratoire.

**CCMH** : Concentration Corpusculaire Moyenne en Hématies.

**CdCl<sub>2</sub>** : Chlorure de cadmium.

**CMV** : Complexe Multi vitaminique.

**DCPS** : 2-4 dichlorophénol sulfonate.

**DSEO** : Dose Sans Effet Observable.

**DJA** : Doses Journalières Admissibles.

**DJT** : Dose Journalière Tolérable.

**DL<sub>50</sub>** : Dose Létale 50.

**E.D.T.A** : Acide Ethylène Diamino Tétra Acétique.

**ETM** : Eléments de Traces Métalliques.

**FAO** : Food and Agriculture Organization.

**FNS** : Formule Numération Sanguine.

**Gr** : Grossissement.

**HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>** : Bicarbonates.

**HE** : Hématoxyline-Eosine.

**HgCl<sub>2</sub>** : Chlorure de mercure (II).

**H<sub>2</sub>So<sub>4</sub>** : Acide sulfurique.

**ISO** : Organisation International de Normalisation.

**J** : Jour.

**KDa** : Kilo dalton.

**mé/L** : Milli-équivalent.

**N** : Normalité.

**NA** : Norme Algérienne.

**NaOH** : La soude.

**NF** : Norme Français.

**NK** : Cellules Naturelle Killer.

**OMS** : Organisation Mondiale de Santé.

**PbC<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>** : l'acétate de plomb(II).

**PE** : Prise d'Essai.

**S** : Semaine.

**T** : Total.

**TCMH** : Concentration moyenne en hémoglobine.

**V** : Volume.

**VGM** : Volume Globulaire Moyen.

## REFERENCES

- [1]. Soubra, L., Evaluations scientifiques des risques toxiques liés à certaines substances chimiques (additifs alimentaires) et contaminants (mycotoxines), Thèse de Doctorat, l'Institut des Sciences et Industries du vivant et de l'environnement, Agro Paris Tech, (2008), 224 p.
- [2]. Amarasinghe, B.M.W.P.K. and Williams, R.A., Tea waste as a low cost adsorbent for the removal of Cu and Pb from wastewater, *Chemical Engineering Journal*, V.132, (2007), 299-309.
- [3]. Vidalo, J.L., Spiruline l'algue bleue de santé et de prévention, ED. Dauphin, (2008), 318 p.
- [4]. Darcas, C., Spiruline et malnutrition, *Arch Pediatr*, V.11, n°5, (2004), 446 p.
- [5]. Didier, B., Le joyau bleu de la spiruline: la phycocyanine. *Nutrithérapie* N° 122, (2010), 82-84.
- [6]. Falquet, J., et Hurni, J., Spiruline : aspects nutritionnels, *Antenna Technologies*, (2006), 41 p.
- [7]. Castenholz, R.W., Rippka, R., Herdman, M. et Wilmotte, A., Frome genus *Arthrospira* Stizenbrger 1852 *Bergey's Manual of systemaic Bacteriology*, (2001), 542-543.
- [8]. Ayala, A., Manetti, G., Burgos, R. and Ayala, F., Industrial and semi industrial production of Spirulina, third world potential (modular systems), *International Symposium on Cyanobacteria for Health, Science and Development*, (2006), 77-81
- [9]. Charpy, L., José Langlade, M. et Alliod, R., La Spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique, (2008).

- [10]. Geitler, L., Cyanophyceae. In : Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Osterreich under Schweiz (1932).
- [11]. Gerchwin, M.E. et Belay, A., *Spirulina* in human nutrition and health, édition Taylor et François London, (2008), 312 p.
- [12]. Zarrouk, C., Contribution à l'étude d'une cyanobactérie : influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler , Thèse de doctorat, Faculté des sciences de l'université de Paris, (1966).
- [13]. Jourdan, J.P., Cultivez votre Spiruline. Manuel de culture artisanale pour la production de la spiruline, Publication Antenna Technologie, (2006).
- [14]. Lu, J., Yoshizaki, S. et Takeuchi, T., Acceptability of raw *Spirulina plantensis* by larval tilapia, (2002), 68 p.
- [15]. Belay, A., Algae and health : *Spirulina* ( *Arthrospira*) as a case in point , presented at Biotechnologia algal. Nuevas perspectivas para Latinoamérica, 1er. Congreso latinoamericano sobre biotecnología algal, Buenos Aires-Argentina, October, (2004), 69 p.
- [16]. Clément, G., Production et constituants caractéristiques des algues *Spirulina platensis* et *S. maxima*, Ann.Nutrition, Aliment, N°29, (1975), 477-487
- [17]. Fox, R.D., La Spiruline. Technique, Pratique et Promesse. EDISUD, Aix en Provence, (1999), 246 p.
- [18]. Dillon, J. et Phan, P.A., *Spirulina* as a source of protein in human nutrition. Edition Plenum Press New YORK et London, (1993), 103-107.
- [19]. Bujard, E., Braco, U., Mouron, J., Mottu, F., Nabholz, A., Wuhrmann, J. et Clément, G., Composition et nutritive value of blue-algae (spirulina) and their possible use in food formulations 3<sup>rd</sup> international congress of science and technology, Abstracts, Washington, (1970).
- [20]. Xue, C., Hu, Y., Saito, H., Zhang, Z., Li, Z., Cai, Y., Ou, C., Lin, H. et Lmb, A.B., Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis* , Food Chemistry, 77, (2002), 9-13.

- [21]. Singh, Y. and Kumar, H.D., Adaptation of a strain of *Spirulina platensis* to grow in cobalt- and iodine-enriched media, *J-Appl-Bacteriol*, Vol 76, N°2, (1994),149-54
- [22]. Otles, S. et Pire, R., Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgeae species, *JAOAC Int.* 84(6), (2001), 14-17.
- [23]. Belay, A., Mass culture of *Spirulina* outdoors-the Earthise farms experience. In vonshak, A, ED. *Spirulina platensis (arthspira)*, physiology, cellbiology and biotechnology, Taylor and francis, London (1997).
- [24]. Tokai, Y., Effects of spirulina on caecum content in rats. *Chiba Hygiene College Bulletin*, Vol 5, N°2, Japan, (1987).
- [25]. Richmand, A., Mass culture of cyanobacteria. Edition *Photosynthetic prokaryotes*, Plenum Press, New York et London, (1992), 553-561.
- [26]. Campanella, L., Crescentini, G. and avino, P., Chemical composition and nutritional evaluation of some naturel and commercial food products based on *Spirulina Analisis*, V. 27, (1999), 533-540.
- [27]. Babadzhanov, A.S., Chemical composition of *Spirulina platensis* cultivated in Uzbekistan, (2004).
- [28]. Pierlovisi, C., L'homme et la spiruline : un avenir commun composition chimique, intérêt alimentaires et activités biologique, Paris V-René Descartes, Faculté des Sciences pharmaceutiques et biologiques, Paris, (2007), 162 p.
- [29]. Costa, JAV., Colla, LM., Duarte, P., Kabke, K. and Weber, A., Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (2002), 603-607.
- [30]. Falquet, J., Spiruline : aspect nutritionnels. *Antenna Technologie*, (1996), 22 p.
- [31]. Cohen, Z., *Spirulina platensis* : physiologie, cellbiologie and biotechnology, Edition Vonshak, Tylor et François, Paris, (1997).

- [32]. FAO, La situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture, (2006).
- [33]. Hideki, F., Yukari, T. and Yasuhiro, Y., Effets de la spiruline (*Spirulina platensis*) sur la toxicité rénale causée par le mercure inorganique et le cisplatine. Faculté des sciences pharmaceutiques, Université de Chiba, Japon, Journal of Health Science, (2011), 205-210.
- [34]. Borchers, A.T, Belay, A., Keen, C.L. et Gershwin M.E., Spirulina and Immunity in Gershwin et Belay (ed.), Spirulina in human Nutrition and health, (2007), 177-193.
- [35]. Simpore, J., Kabore, F., Zongo, F., Dansou, D., Bere, A., Pignatelli, S., Biondi, D.M., Ruberto, G. and Musumeci, S., Nutrition rehabilitation of undernourished children utilizing Spiruline and Misola. Nutrition journal (2006), 53 p.
- [36]. Hsiao, G., Phycocyanine, inhibitor a very potent and novel platelet aggregation commoner forms of bacteria. J. Agric. Food (2005), 53 p.
- [37]. Prati, M., Moltenib, M., Pomatia, F., Rossetti, C. et Bernardinia, G., Biological effet of the *Planktothrix sp*, FP1 cyanobacterial extract, Toxicon 40(3), (2001), 267-272.
- [38]. Ramirez, D., Gonzalez R., Merino, N., Rodriguez, S. et Ancheta, O., Inhibitory effects of Spirulina in zymosan-induced arthristis in mince, Mediators inflammation, (2002), 75-79.
- [39]. Miquel G., Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé, Rapport parlementaire, N° 2979 / N° 261, Paris, Assemblée Nationale / Sénat, Office partementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, (2012).

- [40]. Bliefert, C. Perraud, R., Chimie de L'environnement, Air, Eau, Sols, Déchets, Environnemental, Edition De Boeck, (2001), 370-371.
- [41]. Jeannot, R., Lemièrre, B. et Chiron, S., Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués. Orléans : Editions du BRGM, (2001), 83 p.
- [42]. Nieboer, E.E. and Richardson, D.H.S., The replacement of the nondescript term Heavy metals by a biologically and chemically significant classification of Metal ions, Environmental pollution, V.1, n°1, (1980), 3-26.
- [43]. Le Goff, F. et Bonnomet V., Devenir et comportement des métaux dans l'eau, Biodisponibilité et modèles BLM, Rapport technique, Ineris, (2004), 85 p.
- [44]. Tonneau, J. et Hemes , S.L., Printemps des sciences : d'un bout à l'autre, Revue scientifique de la FAO, rapport et étude ADEME édition (2003).
- [45]. Biney, C., Amuzu, A.T. D., Calamari, N., Kaba, I.L. Mbome, H. Naeve, O., Ochumba, O., Osibanjo, V. et Saad, M.A.H., pollution dans l'environnement aquatique africain, Archive de Document de la FAO, (1976).
- [46]. Van der Wal, A., Norde, W., Zhender, J.B. and Lyklema, J., Determination of the total charge in the cell walls of Grampositive bacteria, Colloids Surf. B: Bio-interfaces, V.9, (1997), 81–100.
- [47]. Rérat, A., Les risques alimentaires d'origine chimique. Paris, (2004), 41 p.
- [48]. Bourrelier, P. et Berthelin, J., Contamination des sols par les éléments en traces : Les risques et leur gestion, Paris, (1998), 142-175.
- [49]. Moll, M. et Moll, N., Précis des risques alimentaires. 2<sup>ème</sup> tirage. Paris, (2000), 70 p.
- [50]. Bliefert, C. et Perraud, R., Chimie de l'environnement: aire, eau, sol, déchets, Paris, (2003), 369-386.

- [51]. Benecke J., Guide pratique de toxicologie, Bruxelles, 2<sup>ème</sup> édition, (2004), 154-166.
- [52]. Leyral, G. et Vierling , E., Microbiologie et toxicologie des aliments, France, (2001), 255-258.
- [53]. Viala, A., Eléments de la toxicologie, Edition Technique et Documentation, Lavoisier, France, (1998), 310-319.
- [54]. Tremel-Schaub, A. et Feix, I., Contamination des sols : Transferts des sols vers les plantes, Paris, (2005), 402 p.
- [55]. François, T., Pathologie toxique en milieu de travail. Edition Eska et Lacassagne, 2<sup>ème</sup> édition, France, (1998), 447 p.
- [56]. Haguénor, J.M. et Furon, D., Toxicologie et hygiène industrielles, Paris, (1981), 47-54.
- [57]. Ramade, F., Ecotoxicologie, Edition Masson, Paris, (1979), 194 p.
- [58]. Amiard-Triquet, C., Lagadic, T. et Caquet, F.R., Utilisation de biomarqueurs pour la biosurveillance de la qualité de l'environnement, Edition Tec et Doc, Paris, (1998), 306 p.
- [59]. Viala, A., Toxicologie , Edition Technique et Documentation, Lavoisier, Londre- New York ; 2005, 300 p.
- [60]. Wittebole, X. et Hantson, P., Influence des relations toxicocinétiques-toxicodynamiques sur la prise en charge des patients intoxiqués Réanimation, V.11, n°7, (2002), 533 - 539.
- [61]. Chavéron, H., Introduction à la toxicologie nutritionnelle, Edition Tech et Doc Paris, Lavoisier, (1999), 214 p.
- [62]. Cabridenc, R. et Lundahl, P., Intérêt et limites d'un test daphnie pour l'étude des nuisances des polluants vis à vis de l'environnement, Technique Sciences Méthodes, V.6, n°2, (1974), 340-345.

- [63]. Doumandji, A., Agrosopies volumes 3, notions de toxicologie, INRAA, ALGER, (2009), 168 p.
- [64]. Publication de la Direction de l'environnement de l'OCDE., Document d'orientation pour l'utilisation du système harmonisé de classification des produits chimiques dangereux pour l'environnement aquatique, Série de l'OCDE N° 27, Août 2002.
- [65]. Lawerys, F., Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles, Edition Masson, Paris, (1982), 1ere édition, 134 p.
- [66]. Angelier. E, Ecotoxicologie des eaux courantes, Edition Tec et Doc, Paris (2001), 195 p.
- [67]. Ramade, F., Précis d'écotoxicologie. Tec et Doc, Paris, (1992), 195 p.
- [68]. Lawerys, F., Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles, 2ième édition, Edition Masson, Paris, (1992), 679 p.
- [69]. NAS/NRC., Recommended dietary allowances, National Academy of Science/National Research Council», Washington, (1989).
- [70]. Ramade, F, Lagadic, L., Caquet, T. et Amiard, JC., Utilisation de Biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement, Ed.Tec & Doc, Paris (1998).
- [71]. Say, P.J., Harding, J.P.C. et Whitton, B.A., Aquatic mosses as monitor of heavy metal contamination in the river Etherow, Environmental pollution, (serie b) V.2, Great Britain (1981), 285-307.
- [72]. Simmeauer, A., L'eau, la recherche, l'environnement, 3ième journée scientifiques et techniques sur l'environnement : Limoge. France (1979).
- [73]. WHO., Principles for safety evaluations of food additifs and contaminants, EPICS n°70, Geneva: WHO, (1987).

- [74]. Mc Connell, E.E., Historical review of the rodent bioassay and future directions. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, V.21, (1995), 38-43.
- [75]. Renwick, A.G., Toxicokinetics-pharmacokinetics in toxicology. Principles and Methods of Toxicology, 3rd ed, New York: Raven Press, (1994), 101-147.
- [76]. Renwick, A.G., Toxicokinetics. General and Applied Toxicology, Basingstoke: Macmillan Press, (1993), 121-151.
- [77]. Renwick, A. G., Exposure estimation, toxicological requirements and risk assessments. *The food safety handbook*/ ed. Kees van der heijden et al. TX: Marcel Dekker inc., (1999), 59-94.
- [78]. Jahnke, G.D., Thyroid toxicants: assessing reproductive health effects. *Environ Health Perspect*, V.112, n°3, (2004), 8-363.
- [79]. Rodier, J., L'analyse de l'eau: eaux naturelles, eaux résiduelles, eau de mer, chimie, physicochimie, bactériologie, biologie, 7eme édition, Dunod, Paris, (1984) , 1365 p.
- [80]. Chaney, A.L. et Marbach, C.P., Reagents for determination of urea and ammonia. *Clin Chem*, (1962), 130-132.
- [81]. Tabacco, A., Quantitative determination of urea. *Clin Chem*, (1979), 336 p.
- [82]. Bartels, H., et Bohmer, M., Creatina Cinéticaespectrofotometrica. *Clin Chem Acta*, (1971), 81 p.
- [83]. Schultz, A., Kaplan, A. et Mosby, L., Uric acid. *Clin Chem C.V*, (1984), 1261-1266.
- [84]. Fossati, P., Dossage de l'acide urique. *Clin Chem*, (1980), 227-231.

- [85]. Meattini, F., The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone chromogenic system, dosage de cholesterol total. *Clin Chem.*, (1978), 2161-2165.
- [86]. Bucolo, G., Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clin Chem.*, (1973), 2685-2692.
- [87]. Sysmex Journal International, Vol. 17 N° 2, (2007).
- [88]. Gabe, M., Techniques histologiques, Masson et cie édition, Paris, (1961), 1-1113.
- [89]. ALGERIE. MINISTER DU COMMERCE., Arrêté ministériel du 26 Juillet 2000 relative aux critères de la qualité de l'eau potable. Journal officiel de la république algérienne, N° 51 du 20 Août (2000), 17-22.
- [90]. Baldwin, R.L., Bayne, K.A. and Clarl J.D., Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 1st ed. Washington, D.C.National Academy Press, (1996), 140 p.
- [91]. Clapp, M.J.L. and Bradbrook, C., Growth and longevity of rats fed an agar-bound diet Lab. Anim.16, (1982), 138 p.
- [92]. Carpenter, J.W. and Kolmstetter, C.M., Feeding Small Exotic Mammals. In :HAND MS, LEWIS LD, MORRIS LM, editors, Small Animal Clinical Nutrition, 4thed, Topeka : Mark Morris Institute, (2000), 943-960.
- [93]. Rogers, A.E., Baker, H.J., Lindsey, J.R.and Weisbroth, S.H., Biology and diseases, editors, The Laboratory Rat-Volume I 1st ed. New York : Academic Press, (1979), 123-147.
- [94]. Rosse D.J., Alimentation des Rongeurs et Lagomorphes de compagnie. Thèse Médecin Vétérinaire, n°10, (1999), 113 p.
- [95]. Cunliffe-beamer, T.L., The Laboratory Mouse, editor. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals. 6th ed. Harlow, UK : Longman Scientific and Technical, (1987), 275-295.

- [96]. Neale, R.J., Coprophagy in iron-deficient rats, *Lab. Anim.* 16, (1982), 204 p.
- [97]. Hudson, B.J.F. and Karis, I.G., The lipids of the alga *Spirulina*, *J. Sci. Food Agric* 25, (1974), 759-763.
- [98]. Ehrensreund, D., Use of Rodents in Behavioral Research. In: *Methods of Animal Experimentation*, Vol. 3, Academic Press, New York, (1968), 1-25.
- [99]. Bevan, R., Hawkins, P. and Heath, K., Husbandry refinement for rats, mice, dogs, and non-human primates used in telemetry in procedures, *Lab Anim*, (2004) ,1-10.
- [100]. Baker, H.J., Lindsey, J.R. and Weisbroth, S.H., *The Laboratory Rat*, Vol. II, Research Applications. Academic Press, New York, NY, (1980).
- [101]. Suter, P., Luetkemeier, H. and Zakova, N., Lifespan studies on male and female mice and rats under SPF-laboratory conditions. *Arch. Toxicol. Supp.* 11, (1979), 403 p.
- [102]. IFFA, CREDO., *Animaux de laboratoire*, Paris, (1990), 19 p.
- [103]. Sansone, E.B. and Fox, J.G., Potential chemical contamination in animal feeding studies: Evaluation of wire and solid bottom caging systems and gelled feed, *Lab. Anim.Sci* N° 27, (1977), 457 p.
- [104]. Bhardwaj Shipra, M.K. and Srivastava Upasana Kapoor, L.P.S., A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: Morphological, biochemical and histopathological evaluation. *Food and Chemical Toxicology*, (2010), 1185-1190.
- [105]. Charpy, L., Langlade, M.J. et Alliod., *La Spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique ?* Institut de Recherche pour le Développement, Marseille, (2008), 67 p.

- [106]. Young, W.C., Boling, J.L. and Blandau, R.J., The vaginal smear picture, sexual receptivity and time of ovulation in the albino rat, *Anat*, (1941), 37 p.
- [107]. MSDS, Département de F.S., Fiche signalétique : CHLORURE DE MERCURE(II), Anachemia Canada. Lachine (Montréal), (2011), 4 p.
- [108]. MSDS, Département de F.S., Fiche signalétique : CHLORURE DE CADMIUM, Anachemia Canada. Lachine (Montréal), (2013), 4 p.
- [109]. MSDS, Département de F.S., Fiche signalétique : ACÉTATE DE PLOMB(II), Anachemia Canada. Lachine (Montréal), (2011), 4 p.
- [110]. James, R., Sampath, K., Thangarathinam, R. and Vasudevan, I., Effect of dietary spirulina level on growth, fertility, coloration and leucocyte count in red swordtail, *Xiphophorus helleri*. *Israeli Journal Of Aquaculture Bamidgeh* Vol 58 (2006), 97-104.
- [111]. Kim, C.J., Yoon, S.K., Kim, H.I., Park, Y.H. and Oh, H.M., Effect of *Spirulina platensis* and probiotics as feed additives on growth of shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* Vol 16, (2006), 1248-1254
- [112]. Marieb, P., *Anatomie et physiologie humaine*, 2<sup>ème</sup> édition de Boeck université, Paris, (2005), 730 p.
- [113]. Dieuseart, P., *Guide pratique des analyses médicales*, Paris, Maloine, (1996), 288 p.
- [114]. Metais, P., Perard, G., Jardillier, J., Rervol, A., Siest, J., *Biochimie chimique et métabolique*, Simep France, (1982), 280 p.

- [115]. Kuniiko, S., Kazuto, M., Kazutaka, M., Yoshinori, I., Kazuhizo, T., Hideki, H. et Ryozo, O., Protection by a radical scavenger edaravone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, *European Journal of Pharmacology*, (2002), 203-208.
- [116]. Pollak, J.K., Haras, W., Effets of organochlorine compounds on lipid catabolism of antitumor effect of fetal rat liver mitochondria and microsomes, *Bull Environ Contam Toxicol* N° 28, (1982), 313 p.
- [117]. Schapira, E., *Eléments de biochimie générale*, 7<sup>ème</sup> édition, Flammarion médecine sciences, Paris, (1977), 355 p.
- [118]. Tsinalis, D., et Binet, I., Appréciation de la fonction rénale : créatinémie, urée et filtration glomérulaire. *Néphrologie*, (2006), 414-419.
- [119]. Cherifi, M., *L'apport de la biochimie au diagnostic clinique*. Alger, (2000), 159 p.
- [120]. Wheater, P.R. et Heath, J.W., *Histologie fonctionnelle*, Boeck université, 1<sup>ère</sup> édition, Paris, (2001), 144-335.
- [121]. Haralt, T., *Atlas de poche d'hématologie : Diagnostic pratique morphologique et clinique*, édition Médecine-Sciences, Paris, (2000), 3-19.
- [122]. Zhang, H.Q., Lin, A.P., Sun, Y. Deng, Y.M., Chemo- and radio-protective effects of polysaccharide of *Spirulina platensis* on hemopoietic system of mice and dogs, *Acta Pharmacologica Sinica* Vol 22, (2001), 121-1124.
- [123]. Watanuki, H., Ota, K., Tassakka, Acmar., Kato, T. and Sakai, M., Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* Vol 258, (2006), 157-163.
- [124]. Mager-Stellman, J., *Sécurité et santé au travail*. Organisation internationale du travail, (2000), 400 p.

- [125]. Yamamoto, C., Fujiwara, Y. and Kajia, T., The biological effects of depolymerized sodium spirulan and sulfated colominic acid on vascular cells are beneficial in preventing atherosclerosis. *Journal of Health Science* Vol 52, (2006), 205-210.
- [126]. Zaho, M.Q., Amir, M.K., Rice, W.R. and Enelow, R.I., Types II pneumocyte-CD8+ T-cell interactions. Relationship between target cell cytotoxicity and activation. *Am J Respir cell Mol Biol*, Vol 25 N° 3, (2001), 362-369.